



Caractérisation moléculaire de tumeurs pulmonaires radon-induites chez le rat

Kristell Bastide

► To cite this version:

Kristell Bastide. Caractérisation moléculaire de tumeurs pulmonaires radon-induites chez le rat. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris XI, 2008. Français. NNT : . tel-00349902v2

HAL Id: tel-00349902

<https://theses.hal.science/tel-00349902v2>

Submitted on 16 Nov 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS XI
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD
Ecole doctorale de Cancérologie : Biologie, Médecine, Santé

Année 2008

Thèse n°

THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS XI

Spécialité : Radiobiologie
Présentée et soutenue publiquement par

Kristell GUILLET BASTIDE

Le 13 novembre 2008

TITRE

**CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DE TUMEURS
PULMONAIRES RADON-INDUITES CHEZ LE RAT**

Directeur de thèse : Pr Jean-François BERNAUDIN

JURY

Pr Christian BRAMBILLA	Président
Dr Xavier GIDROL	Rapporteur
Dr Marc BENDERITTER	Rapporteur
Pr Philippe GAULARD	Examineur
Dr Sylvie CHEVILLARD	Examineur
Pr Jean-François BERNAUDIN	Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie vivement Monsieur Gidrol et Monsieur Benderitter d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci à Monsieur Gaulard pour son travail d'examineur et à Monsieur Brambilla qui a accepté de présider le jury.

Merci également au professeur Bernaudin, directeur de thèse auprès de l'Université, qui m'a soutenue et m'a apportée une aide précieuse pour ce travail.

Je tiens à remercier Sylvie Chevillard de m'avoir intégrée dans son laboratoire de Cancérologie Expérimentale au CEA de Fontenay-aux-Roses et de m'avoir encadrée pour préparer cette thèse. Sa rigueur scientifique et ses précieux conseils ont été des plus formateurs.

Mes remerciements vont également à Monsieur Bernard Malfoy de l'Institut Curie dont la disponibilité et l'écoute ont contribué de façon significative à la progression de ce travail de thèse.

Tous mes remerciements vont aussi à mes collègues de travail du laboratoire de Cancérologie Expérimentale qui ont suivi de près ou de loin l'évolution de cette thèse. Merci à Céline Levalois et Sandrine Morel-Altmeier pour leurs informations techniques précieuses. Un merci tout particulier à Bruno Lectard pour les manip conséquentes qu'il a exécutées avec zèle et intérêt. Merci à Jérôme Lebeau et Cathy Ory pour leur disponibilité et leurs conseils et Nicolas Ugolin pour son expertise dans l'analyse des données de puces à ADN. J'exprime toute ma reconnaissance à Marie-Noëlle Guilly qui a été témoin de mes espoirs et de mes doutes, et qui m'a encouragée toutes ces années. Enfin, merci à vous, Sandrine Roch et Audrey Dubecq, collègues temporaires de cette période de thèse, pour votre franche amitié.

Merci à mes parents et à Jiji qui ont réussi à suivre les avancées de ma thèse avec calme et intérêt en trouvant les mots pour me soutenir. Je leur dédie cet ouvrage qui clôt le chapitre de mes études. Avec toute ma reconnaissance.

Merci à toi, Laurent, pour ta patience grandement mise à l'épreuve et ton soutien quotidien au cours de ces dernières années. J'espère être digne de ta confiance et pouvoir te rendre la pareil « tout au long de notre vie » !

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	3
LISTE DES ABRÉVIATIONS	7
AVANT-PROPOS	10
INTRODUCTION	12
I. LES RAYONNEMENTS IONISANTS ET LEURS EFFETS SUR LE VIVANT	12
1. CARACTERISTIQUES DES RAYONNEMENTS IONISANTS	12
A/ Les différents types de rayonnements ionisants	12
B/ Les doses	13
a) Dose absorbée	13
b) Dose équivalente	13
c) Dose efficace	13
2. EFFET DES RADIATIONS AU NIVEAU CELLULAIRE	14
A/ Interactions des rayonnements ionisants avec la cellule	14
B/ Réparation des dommages de l'ADN	15
a) Réparation par excision de base	15
b) Réparation par excision de nucléotide	17
c) Réparation des cassures double brin	18
<i>i. Jonction des extrémités non homologues</i>	19
<i>ii. La recombinaison homologue</i>	19
<i>iii. Réparation fautive par « Single Strand Annealing »</i>	19
C/ Arrêt du cycle cellulaire	21
a) Les gènes majeurs du cycle cellulaire	21
<i>i. Le gène RB1</i>	21
<i>ii. Le gène TP53</i>	22
<i>iii. Les gènes p16INK4a et p14ARF</i>	23
b) Arrêt du cycle radio-induit en phase G1	23
c) Arrêt du cycle radio-induit en phase S et G2/M	24
D/ Apoptose radio-induite par p53	25
a) Voie mitochondriale	27
b) Voie des récepteurs de mort	27
c) Inhibition des inhibiteurs de caspases	27
E/ Instabilité génomique radio-induite	27
a) Mutations radio-induites	28
b) Instabilité chromosomique	29
3. EFFETS DES RADIATIONS AU NIVEAU DE L'ORGANISME	29
A/ Les effets déterministes	30
B/ Les effets stochastiques	30

4. LES CANCERS RADIO-INDUITS CHEZ L'HOMME : DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES	31
A/ Les expositions militaires ou accidentelles	32
a) Les survivants d'Hiroshima et de Nagasaki	32
b) L'accident de Tchernobyl	33
B/ L'exposition industrielle	35
C/ L'exposition professionnelle et domestique au radon	36
a) Données sur le radon	36
b) Etudes de cohortes de mineurs	39
c) Etudes cas-témoins dans la population générale	39
D/ Limites des études épidémiologiques	40
5. APPORT DE L'EXPERIMENTATION ANIMALE POUR L'EVALUATION DU RISQUE DE CANCER DU POUMON APRES INHALATION DE PARTICULES α	41
II. NATURE HISTOLOGIQUE DES CANCERS PULMONAIRES	43
1. CANCERS DU POUMON CHEZ L'HOMME	43
A/ Les carcinomes bronchiques à petites cellules	44
B/ Les cancers bronchiques non à petites cellules	45
a) Le carcinome épidermoïde (Sq)	45
b) L'adénocarcinome (AC)	46
c) Le carcinome à grandes cellules (CPGC)	46
d) Le carcinome adénoquameux (ASq)	47
2. TUMEURS PULMONAIRES CHEZ LE RAT	47
III. EVOLUTION HISTOLOGIQUE ET GENETIQUE DES PRINCIPAUX TYPES DE CBNPC	49
1. DEVELOPPEMENT DES CARCINOMES EPIDERMOÏDES	50
2. DEVELOPPEMENT DES ADENOCARCINOMES	50
3. CAS PARTICULIER DES CARCINOMES ADENOSQUAMEUX	51
IV. LES GENES MAJEURS DE LA CARCINOGENESE PULMONAIRE	52
1. LE GENE TP53	52
A/ Dérégulation de TP53 dans les tumeurs pulmonaires humaines	52
B/ Dérégulation de Tp53 dans les cancers pulmonaires chez le rat	53
C/ Dérégulation de la protéine p53 par MDM2	54
2. LE LOCUS CDKN2A	54
A/ Dérégulation de p16INK4a dans les cancers pulmonaires humains	54
B/ Dérégulation de p16Ink4a dans les cancers pulmonaires chez le rat	55
C/ Dérégulation du transcrit alternatif p14ARF/p19Arf	56

3. AUTRES GENES DE LA CARCINOGENESE PULMONAIRE	57
A/ Le gène p15INK4b	57
B/ Le gène RB1	58
C/ Les gènes RAS	59
D/ Les gènes MYC	60
4. AUTRES REGIONS CHROMOSOMIQUES FREQUEMMENT ALTEREES ET GENES CANDIDATS	61
A/ Délétion du 3p	61
B/ Délétion du 4q	62
C/ Délétion du 5q	63
D/ Délétion du 13q	63
E/ Délétion du 10q	64
F/ Gains récurrents	64
V. APPORT DE LA TRANSCRIPTOMIQUE POUR L'ETUDE DE LA CARCINOGENESE PULMONAIRE	65
1. LES PUCES A ADN DANS L'ETUDE DES TUMEURS PULMONAIRES	65
A/ Profil transcriptomique des carcinomes à petites cellules	66
B/ Profil transcriptomique des carcinomes épidermoïdes	66
C/ Profil transcriptomique des adénocarcinomes	67
D/ Profil transcriptomique des carcinomes à grandes cellules	68
E/ Conclusion	68
2. TRANSCRIPTOME ET DIFFERENCIATION TUMORALE	69
INTRODUCTION AU PROGRAMME DE RECHERCHE	71
RÉSULTATS	73
CHAPITRE I	
ETUDE DES DESEQUILIBRES CHROMOSOMIQUES DANS LES TUMEURS PULMONAIRES RADON-INDUITES CHEZ LE RAT	73
INTRODUCTION	73
RESULTATS	73
DISCUSSION	74
CHAPITRE II	
ANALYSE MOLECULAIRE DES VOIES P16INK4A/RB1 ET P19ARF/TP53 DANS LES TUMEURS PULMONAIRES RADON-INDUITES CHEZ LE RAT	78
INTRODUCTION	78
RESULTATS	78
DISCUSSION	80
ARTICLE	

CHAPITRE III

CARACTERISATION DES TUMEURS MIXTES ASQ RADON-INDUITES CHEZ LE RAT PAR ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE COMPARATIVE. 83

INTRODUCTION	83
RESULTATS	83
DISCUSSION	89

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 94

ANNEXES 98

ANNEXE 1

DISPOSITIF D'EXPOSITION AU RADON ET NATURE DES TUMEURS PULMONAIRES INDUITES CHEZ LE RAT 98

ANNEXE 2

TECHNIQUE DE CGH POUR L'ANALYSE CYTOGENETIQUE DES TUMEURS PULMONAIRES 100

1. PREPARATION DE CHROMOSOMES METAPHASIQUES NORMAUX	100
2. EXTRACTION ET MARQUAGE DIFFERENTIEL DES ADN GENOMIQUES	100
3. HYBRIDATION DES SONDAS GENOMIQUES	101
4. ACQUISITION ET ANALYSE DES IMAGES, INTERPRETATION DES PROFILS CGH	102

ANNEXE 3

TECHNIQUE DES PUCES A ADN POUR L'ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DES TUMEURS PULMONAIRES 104

1. DEFINITION ET PRINCIPE EXPERIMENTAL DES PUCES A ADN	104
2. EXTRACTION DES ARN, AMPLIFICATION ET MARQUAGE DES ADNC	105
3. HYBRIDATION DES CIBLES D'ADNC	105
4. ACQUISITION ET ANALYSE DES DONNEES	107

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 115

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC	Adénocarcinome
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ASq	Carcinome adénosquameux
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
Bq	Becquerel
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> pour albumine sérique bovine
CBNPC	Carcinome broncho-pulmonaire non à petites cellules
CBPC	Carcinome bronchique à petites cellules
CDB	Cassure double brin
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> pour kinase dépendante d'une cycline
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> pour inhibiteur de kinase 2A dépendant d'une cycline
CDKN2B	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B</i> pour inhibiteur de kinase 2B dépendant d'une cycline
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i> pour hybridation génomique comparative
CIPR	Commission Internationale de Protection Radiologique
Cldn7	Claudine 7
CPGC	Carcinome pulmonaire à grandes cellules
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase 2</i> pour kinase 2 régulée par des signaux extracellulaires
ERR	Excès de risque relatif
FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i> pour hybridation fluorescente in situ
FITC	<i>Fluoresceine Iso Thio Cyanate</i>
FOS	<i>FBJ osteosarcoma oncogene</i>
GDP	Guanosine DiPhosphate
GTP	Guanosine TriPhosphate
Gusb	Gène codant pour la Glucuronidase Beta
Gy	Gray

HD	<i>Homozygous deletion</i> pour délétion homozygote
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i> pour facteur de croissance des hépatocytes
HL	Profil transcriptomique <i>High versus Low</i> (fort versus faible)
HPRT	Hypoxantine Guanine Phosphoribosyl Transférase
JENH	Jonction des extrémités non homologues
JNK	c-Jun NH2-terminal kinase
K-RAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog</i>
LCC	<i>Large cell Carcinoma</i> pour carcinome à grandes cellules
LH	Profil transcriptomique <i>Low versus High</i> (faible versus fort)
LOH	<i>Loss Of Heterozygosity</i> pour perte d'hétérozygotie
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> pour protéine kinase activée pour la prolifération cellulaire
MDM2	<i>Mouse Double Minute 2 homolog</i>
MDM4	<i>Mouse Double Minute 4 homolog</i>
MSP	<i>Methylation Specific PCR</i> pour PCR spécifique de la méthylation
MYC	<i>Myelocytomatosis viral oncogen homolog (avian)</i>
NpO ₂	Dioxyde de Neptunium
NSCLC	<i>Non-Small Cell lung Cancer</i> pour carcinome pulmonaire non à petites cellules
MUC1	Mucine 1
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
p14 ^{ARF}	Gène codant pour la protéine p14 ^{ARF} (<u>p19Arf</u> chez le rongeur, <u>ARF</u> en anglais)
p14 ^{ARF}	<i>Protein 14 alternate open reading frame of Cdkn2a</i> pour protéine 14 transcrit alternatif de Cdkn2a
p15 ^{INK4b}	Gène codant pour la protéine 15 inhibitrice de la kinase Cdk4 (p15 ^{INK4b}) ou <i>Protein 15 Inhibitor of Kinase 4B</i>
p16 ^{INK4A}	Gène codant pour la protéine p16 ^{INK4a} (<u>INK4a</u> en anglais)
p16 ^{INK4a}	<i>Protein 16 Inhibitor of Kinase 4A</i> pour protéine 16 inhibitrice de la kinase Cdk4
p21 ^{WAF1}	<i>Protein 21 wild-type p53-activated fragment 1</i> pour protéine 21 activée par p53 sauvage
p53	Protéine 53
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> pour Réaction de polymérisation en chaîne
pRb	Protéine Rb (rétinoblastome)
PuO ₂	Dioxyde de plutonium

RAS	<i>Rat sarcoma virus oncogene</i> pour oncogène viral du sarcome de rat
RB1	Gène codant pour Rétinoblastome 1
REB	Réparation par excision de base
REN	Réparation par excision de nucléotide
RH	Recombinaison homologue
RI	Rayonnements Ionisants
RT	<i>Reverse Transcription</i> pour transcription inverse
RT-PCR	<i>Real Time PCR</i> pour PCR en temps réel (ou PCR quantitative)
SCC	<i>Squamous Cell Carcinomas</i> pour carcinome épidermoïde
SCLC	<i>Small Cell lung Cancer</i> pour Carcinome pulmonaire à petites cellules
SFTP	<i>Surfactant, pulmonary-associated protein</i> pour protéine associée au surfactant pulmonaire
Sq	Carcinome épidermoïde (ou squameux)
SSA	<i>Single strand annealing</i>
SSC	<i>Sodium Chloride Sodium Citrate buffer</i> pour tampon au chlorure et au citrate de sodium
Sv	Sievert
TEL	Transfert d'énergie linéique
TP53	Gène codant pour la protéine tumorale p53 ou <i>Tumor Protein p53</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor A</i> pour facteur de croissance des cellules vasculaires endothéliales
WL	<i>Working Level</i> pour niveau de travail
WLM	<i>Working Level Month</i> pour niveau de travail sur un mois

AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

En 1896, Henri Becquerel mit en évidence un nouveau rayonnement alors qu'il faisait des recherches sur la phosphorescence des sels d'uranium. Son étudiante, Marie Curie, confirmera en quelques mois que ce rayonnement est une propriété de plusieurs éléments chimiques dont le polonium et le radium, et baptisera cette propriété la « radioactivité », en 1898. Rapidement, les scientifiques se rendirent compte que les rayonnements ionisants pouvaient produire des effets nuisibles sur l'homme. Ainsi, trois mois après la découverte des rayons X par le physicien Röntgen en 1895, leurs effets irritants sur l'œil étaient décrits. En 1902, le premier cas de cancer radio-induit fut diagnostiqué chez un travailleur maniant à mains nues des tubes à rayons X et en 1910 à Paris, Pierre Marie provoqua expérimentalement les premiers cancers radio-induits chez l'animal. Les toutes premières recommandations de protection contre les rayons X furent adoptées en 1915 par la société britannique Röntgen. En 1928, une relation de cause à effet entre radiation et cancer fut admise, justifiant que soient édictées, par la Commission Internationale de Protection radiologique (CIPR, issue en 1928 de la Société Internationale de Radiologie), les premières recommandations concernant les limites professionnelles d'exposition.

Dans le domaine de l'exploitation des mines d'uranium, des cancers bronchiques furent observés chez les mineurs suite à l'exposition chronique au radon, un gaz radioactif naturel qui s'accumule dans les galeries souterraines. Dans le domaine de la santé, il fut montré que les radiations ionisantes utilisées dans un but thérapeutique pouvaient engendrer un second cancer dans le territoire irradié. Il a fallu attendre les années 1950 et les premières études sur les survivants des explosions nucléaires d'Hiroshima et Nagasaki pour que se mettent en place des études épidémiologiques d'envergure qui se sont avérées utiles pour adapter les normes de sécurité pour les travailleurs du nucléaire et pour la protection du public.

Actuellement, en France, l'exposition majeure de l'homme aux radiations naturelles est due au radon, issu des matériaux de construction, qui s'accumule dans les habitations mal ventilées et qui se dépose dans les poumons après inhalation. Cependant, si les effets des irradiations à fortes doses sont connus, il est actuellement impossible de dire si un individu soumis à une faible dose et/ou à un faible débit de dose d'irradiation développera ou non un cancer. Mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans le développement tumoral après inhalation de radon pourrait aider à une meilleure estimation du risque de cancer pulmonaire à faibles doses.

Dans ce but, les caractéristiques moléculaires des tumeurs pulmonaires radon-induites ont été étudiées au cours de ce travail de thèse. Cette étude menée in vivo chez le rat apporte des données fondamentales pour aboutir, à terme, à une meilleure caractérisation des tumeurs radio-induites chez l'homme. La première partie de ce manuscrit est consacrée à une revue des données bibliographiques. Après quelques rappels sur les effets carcinogènes des rayonnements ionisants sur l'organisme, les principales données des études épidémiologiques menées sur des cohortes exposées aux radiations ionisantes seront présentées, ainsi que les apports de l'expérimentation animale pour l'évaluation du risque de cancer pulmonaire. Les différents types de tumeurs pulmonaires chez l'homme et chez le rat seront décrits et les différentes hypothèses d'évolution clonale des cancers pulmonaires non-à petites cellules seront exposées. Puis, une revue de la littérature sur les gènes majeurs impliqués dans la carcinogenèse pulmonaire chez l'homme et chez le rongeur ainsi que sur les données plus récentes d'analyse du transcriptome sera proposée.

La présentation des travaux de recherche sur les tumeurs pulmonaires radon-induites chez le rat s'articulera en trois parties : 1) l'analyse génomique globale des tumeurs par CGH pour définir les gains ou pertes de matériel chromosomique récurrents; 2) l'étude plus spécifique de la dérégulation des gènes suppresseurs de tumeur p16Ink4a, p19Arf, Rb1 et Tp53, largement décrits comme impliqués dans la carcinogenèse pulmonaire en général; et 3) l'analyse transcriptomique comparative des différents types de tumeurs radon-induites pour mieux caractériser les carcinomes adénosquameux, fortement représentés dans notre modèle, et encore mal caractérisés chez l'homme.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. Les rayonnements ionisants et leurs effets sur le vivant

1. Caractéristiques des rayonnements ionisants

A/ Les différents types de rayonnements ionisants

Les radioéléments sont des éléments chimiques instables qui se transforment spontanément en émettant des rayonnements ionisants (RI) et en donnant un ou plusieurs éléments fils qui peuvent être stables ou radioactifs. Ces éléments, aussi appelés radio-isotopes, se caractérisent par la nature et l'énergie des rayonnements qu'ils émettent. Il existe plusieurs types de rayonnements : alpha (α), bêta (β), neutrons, photons X et/ou gamma (γ). Ils sont dits ionisants car leur énergie est suffisante pour arracher un électron à un des atomes d'une structure moléculaire qu'ils rencontrent.

- Le rayonnement α est émis par des éléments contenant un excès de nucléons. Une particule alpha chargée positivement est éjectée, qui correspond à un noyau d'Hélium (${}^4_2\text{He}$) constitué de 2 protons et de 2 neutrons.

- Le rayonnement β est émis par des éléments présentant un excès de neutrons ou de protons. Des particules bêta à charge négative (β^- ou électrons) ou à charge positive (β^+ ou positrons) sont éjectées respectivement.

- Les rayonnements neutres peuvent être corpusculaires comme les neutrons ou électromagnétiques comme les photons X et gamma.

L'activité d'une quantité donnée de radioélément est définie par le nombre de désintégrations nucléaires spontanées observées par unité de temps à un instant donné. L'unité de mesure est le becquerel (Bq) qui correspond à une désintégration par seconde, quelque soit la nature du rayonnement.

Chaque rayonnement se caractérise par son Transfert d'Energie Linéique (TEL), exprimé en keV/ μm , et définissant la quantité moyenne d'énergie déposée par unité de longueur. Les rayons X et gamma, délivrés à l'homme lors d'irradiations à visée médicale, diagnostique (radiographie) ou thérapeutique (radiothérapie) sont dits à faible TEL. Ils ne perdent que peu d'énergie au contact de la matière et peuvent ainsi traverser d'importantes épaisseurs, ce qui les rend potentiellement dangereux par irradiation interne et externe. En revanche, les

particules α ont un TEL élevé et leur parcours dans la matière est court. Ces rayonnements sont peu pénétrants et n'induisent que peu de dégâts par irradiation externe. Par contre, après une contamination interne par inhalation ou ingestion, leur fort pouvoir ionisant sur les cellules les rend particulièrement délétères.

B/ Les doses

a) Dose absorbée

La dose reçue par un corps exposé à un rayonnement correspond à la dose absorbée (D) qui se définit comme l'énergie reçue par unité de masse. L'unité de mesure est le Gray (1 Gy = 1 Joule/kg).

b) Dose équivalente

La dose absorbée, par un organe ou un tissu, peut être pondérée par un facteur de pondération (W_R) en fonction de la qualité du rayonnement, on parle alors de la dose équivalente (H) exprimée en sievert (Sv)

$$H \text{ (Sv)} = D \text{ (Gy)} \times W_R$$

W_R exprime l'efficacité d'un rayonnement donné à entraîner une complication tardive (cancer, anomalies génétiques) chez l'homme. Par exemple, les rayonnements α sont 20 fois plus « efficaces » à produire ces effets que les rayons X ou γ , le facteur de pondération est alors de 20 pour les alpha. Les valeurs de W_R suivantes ont été attribuées par la CIPR :

- particules α : 20
- électrons β : 1
- neutrons : 5 à 20 (selon l'énergie)
- photons X ou γ (toutes énergies) : 1

c) Dose efficace

La dose efficace (E), également exprimée en sievert, est la somme des doses équivalentes délivrées à chaque organe ou tissu pondérées par le facteur de pondération tissulaire W_T .

$$E \text{ (Sv)} = \sum H \text{ (Sv)} \times W_T$$

A l'inverse de W_R , W_T est indépendant du type de rayonnement, mais spécifique du tissu cible (tableau 1). Il prend en compte la mortalité par cancer en fonction de la localisation tissulaire.

Tissu/Organe	W_T
gonades	0,2
moelle osseuse	0,12
colon	0,12
poumon	0,12
estomac	0,12
vessie	0,05
sein	0,05
foie	0,05
œsophage	0,05
thyroïde	0,05
peau	0,01
surface des os	0,01
autres tissus	0,05

Tableau 1 Facteurs de pondération tissulaire

En conclusion, deux unités permettent d'exprimer la dose d'irradiation : le gray est l'unité utilisée en radiobiologie et en radiothérapie et le sievert est l'unité utilisée en radioprotection.

2. Effet des radiations au niveau cellulaire

A/ Interactions des rayonnements ionisants avec la cellule

Les effets des RI sur la cellule peuvent être produits par interaction directe ou par l'intermédiaire des espèces réactives de l'oxygène. L'effet direct des RI résulte d'un dépôt d'énergie sur le substrat qui peut conduire à une ionisation ou à une excitation de la matière. L'effet indirect résulte de l'interaction du rayonnement avec les molécules d'eau ce qui, après radiolyse, conduit à la production de radicaux libres. Ces molécules à forte réactivité peuvent léser les constituants cellulaires tels que les protéines, les phospholipides membranaires ou l'ADN. La radiolyse de l'eau est la réaction prédominante observée avec les rayonnements à faible TEL. Pour les rayonnements de TEL élevé, comme les particules α , ce sont les effets directs liés au dépôt d'énergie qui sont majoritaires. Au niveau de la molécule d'ADN, les dommages peuvent être de différents types : dommages de bases et de sucres, pontages ADN / protéines, pontages inter-brins ADN-ADN, cassures simple ou double brin par rupture des liaisons phosphate-sucres. Ces différents types de dommages de l'ADN vont avoir des conséquences variables pour la cellule. La cassure double brin (CDB) est considérée comme la lésion radio-induite la plus délétère pour la cellule. Parmi les dommages oxydatifs de bases, certains entraînent une distorsion de l'ADN qui bloque les polymérases lors de la réplication

et sont par conséquent potentiellement létaux. Les différents dommages oxydatifs ne sont pas tous mutagènes ; pour certaines altérations de bases, les polymérases ne vont pas reconnaître que la base est endommagée et vont introduire le « bon » nucléotide lors de la réplication.

B/ Réparation des dommages de l'ADN

Les systèmes de réparation de l'ADN ont pour but de maintenir l'intégrité du génome et d'assurer la survie cellulaire. Ils sont multiples et possèdent une spécificité de reconnaissance des différents types de dommages [1]. Il est maintenant admis que des déficiences acquises ou héritées dans ces systèmes de réparation contribuent significativement au déclenchement de cancers.

a) Réparation par excision de base

La réparation par excision de base (REB) prend en charge les bases modifiées (oxydées, alkylées, désaminées, hydroxylées) et les cassures simple brin de l'ADN. Les différentes étapes de ce mécanisme de réparation sont représentées en figure 1 (pour revue [2, 3]). Dans ce système, les bases modifiées sont reconnues par les N-glycosylases, une famille d'enzymes pouvant rompre la liaison base-sucre d'une base altérée et générer des sites abasiques, comme ceux pouvant se former spontanément par hydrolyse. L'endonuclease APEX1 incise alors l'ADN en 5' du site abasique. Deux voies de réparation sont alors possibles : la voie de réparation courte qui porte sur un ou deux nucléotides, et la voie de réparation longue qui insère 2 à 20 nucléotides. La voie de réparation courte, majoritaire dans les cellules de mammifères, met en jeu la protéine XRCC1 et la polymérase β qui éliminent le résidu abasique et comblent la brèche en utilisant le brin complémentaire comme matrice. Le complexe XRCC1-ligase 3 effectue alors la jonction des brins d'ADN. La voie de réparation longue implique la re-synthèse de plusieurs nucléotides grâce au complexe PCNA-Polymérase δ/ϵ , avec déplacement du brin existant endommagé qui sera excisé par la DNase FEN1. La ligase 1 intervient pour la ligation du brin réparé.

Les cassures simples brin sont détectées par la polymérase PARP1 et la protéine XRCC1, les extrémités libres étant protégées et transformées par une polynucléotide kinase 3'-phosphatase (PNKP). Le comblement de la brèche s'effectue ensuite soit par la voie de réparation courte, préférentielle, soit par la voie de réparation longue.

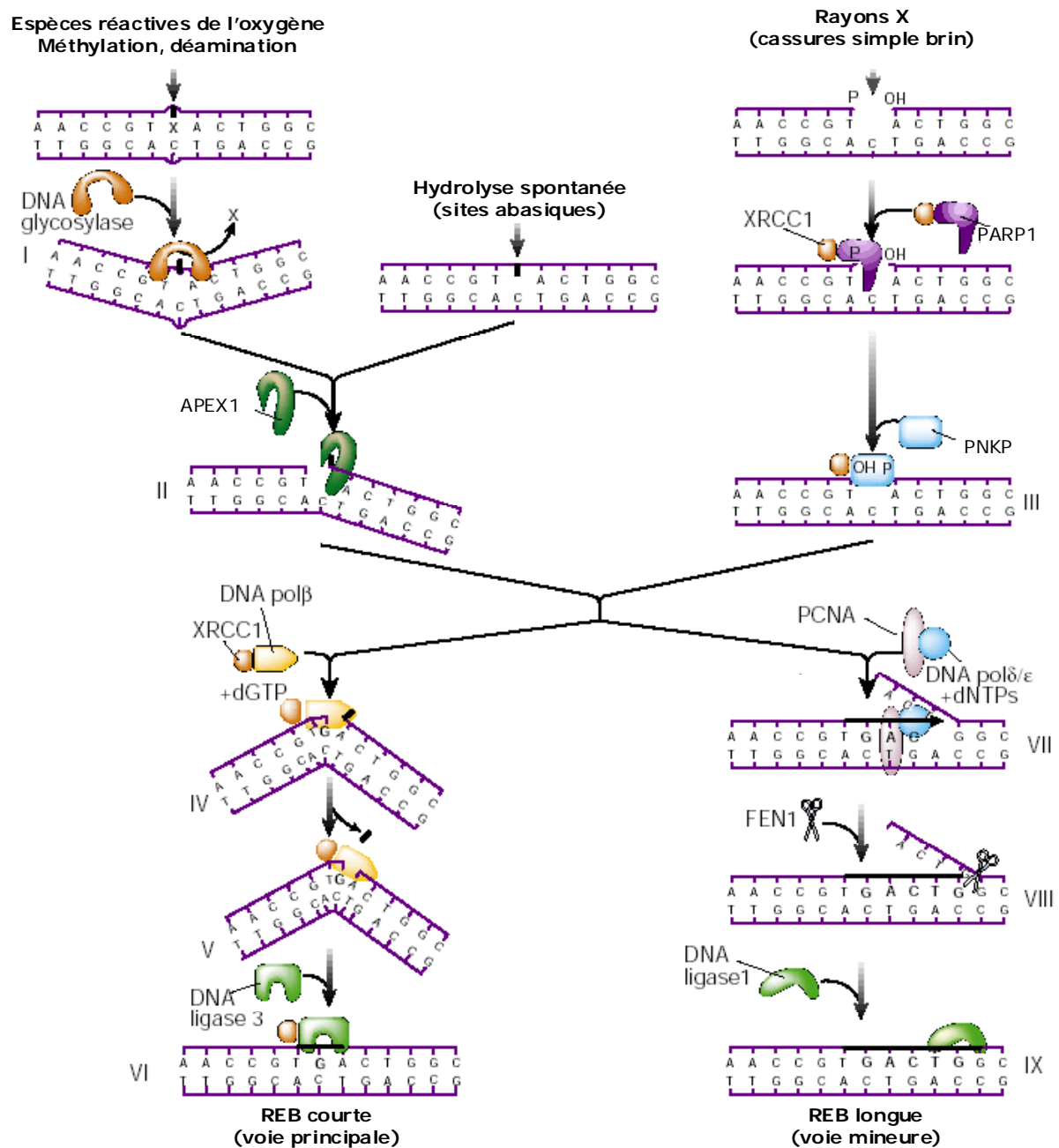


Figure 1 Mécanismes de réparation par excision de base (REB) (d'après Hoeijmakers [2])

b) Réparation par excision de nucléotide

La réparation par excision de nucléotide (REN) permet d'éliminer les dommages volumineux (pontages intra-chaîne, pontages protéine-ADN) qui induisent une distorsion de la molécule d'ADN. Selon que ces dommages bloquent l'élongation de la polymérase II ou non, la réparation sera couplée à la transcription (TC-REN) ou interviendra sur le génome global, indépendamment de la transcription (GG-REN) (figure 2) (pour revue [2, 4]).

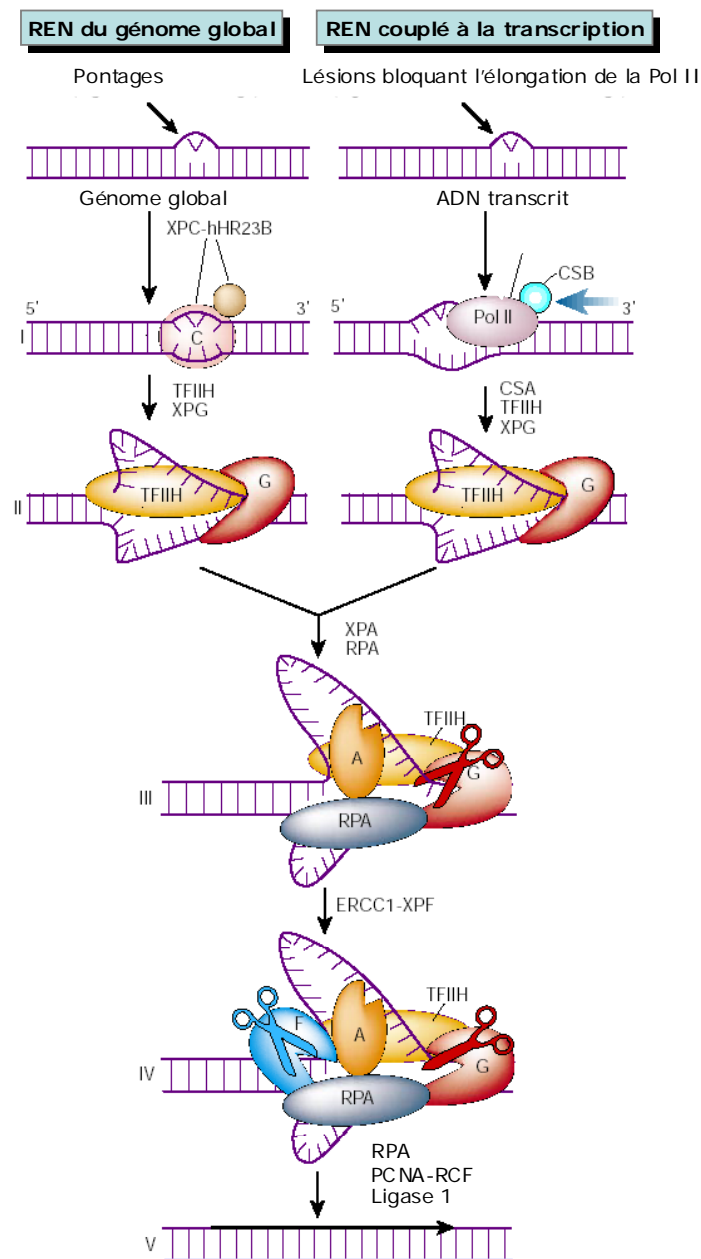


Figure 2 Mécanisme de réparation par excision de nucléotide (REN)
(d'après Hoeijmakers [2])

Dans la réparation GG-REN, les dommages sont reconnus par le complexe protéique XPC-hHR23B tandis que dans la voie TC-REN, c'est le blocage de la progression de la polymérase II qui, associé aux protéines CSA et CSB, va permettre le recrutement des complexes protéiques de réparation. Les étapes suivantes d'excision, resynthèse et ligation sont communes aux deux voies. Les hélicases XPB et XPD appartenant au facteur de transcription TFIIH ouvrent la double hélice sur une trentaine de paires de bases pour libérer le site de la lésion. Les facteurs XPA et RPA peuvent alors se fixer et stabiliser l'ouverture pour permettre aux endonucléases XPG et ERCC1-XPF de cliver respectivement en 3' et en 5' les bords de la portion d'ADN ouverte. La re-synthèse du brin endommagé fait intervenir les polymérases δ et ϵ ainsi que les facteurs de réplication RPA, RFC et PCNA.

c) Réparation des cassures double brin

La détection des CDB s'effectue grâce à deux phosphatidyl-inositol-3-OH-like kinases à activité sérine-thréonine kinase, ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) et dans une moindre mesure ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*) qui sont capables de phosphoryler de nombreuses protéines impliquées dans la réparation de l'ADN telles que Brca1 ou Nbs1. Deux mécanismes majeurs de réparation des CDB peuvent être activés par ATM/ATR en fonction de la phase du cycle cellulaire dans laquelle la cellule endommagée se trouve (figure 3) [2, 5, 6]. La recombinaison homologue (RH), qui nécessite la présence des deux brins homologues de l'ADN, s'effectue principalement en fin de phase S ou en phase G2, lorsque la réplication a eu lieu. La réparation par jonction des extrémités non homologues (JENH) intervient préférentiellement en phase G1 et S lorsque la cellule ne dispose pas d'une copie d'ADN non endommagée. En cas d'accumulation ou de présence persistante de CDB, JENH et RH semblent également être activées de manière séquentielle : le mécanisme de JENH interviendrait très rapidement après la formation des CDBs tandis que la RH ne se produirait qu'après arrêt du cycle cellulaire [7, 8].

Une troisième voie de réparation fautive par « Single Strand Annealing » (SSA) est considérée comme une forme particulière de la réparation par recombinaison homologue, mais cette voie n'est pas fidèle. Elle concerne les cassures double brin qui surviennent au niveau des séquences d'ADN répétées.

i. Jonction des extrémités non homologues

Deux hétérodimères Ku formés des protéines Ku70 et Ku80 se fixent sur les extrémités libres des cassures et se lient à la sous-unité catalytique de la protéine kinase ADN-dépendante DNA-PKcs (figure 3). Ce complexe permet de protéger et de rapprocher les extrémités libres puis d'enclencher le processus de modification des extrémités pour permettre l'étape finale de ligation. Ce processus, mal connu, ferait intervenir des nucléases et/ou polymérases capables de supprimer ou allonger une extrémité débordante incompatible avec la ligation. Il serait responsable de la perte occasionnelle de nucléotides qui rend la voie JENH moins fidèle que la RH. Le complexe Rad50/Mre11/Nbs1, la Dnase Fen1 ou encore l'endonucléase Artemis activée par association avec la DNA-PKcs sont potentiellement impliqués dans ce processus [5]. L'étape finale de ligation est assurée par le complexe ADN-ligase 4/XRCC4 et serait modulée par la présence de la protéine XLF/Cernunnos récemment découverte, qui semble pouvoir interagir avec le complexe de ligation [5].

ii. La recombinaison homologue

La recombinaison homologue permet de réparer les cassures double-brin en utilisant la chromatide sœur, non endommagée comme modèle. Cette voie de réparation est plus fidèle que la JENH. La cassure est reconnue par le complexe Rad50/Mre11/Nbs1 dont l'activité exonucléase va permettre de digérer une partie de l'ADN pour libérer des extrémités 3' simple brin (figure 3). Les protéines RPA et Rad52, qui se lient alors aux terminaisons 3' libres, vont stimuler et faciliter l'assemblage de filaments nucléoprotéiques sur le simple brin d'ADN composés de Rad51 ainsi que des protéines Xrcc2, Xrcc3 et Rad54. Le recrutement de Rad51 est facilité par Brca1 et Brca2. Les brins porteurs des filaments vont alors s'apparier chacun avec le brin d'ADN homologue pour former un hétéroduplex. Les brins tronqués sont re-synthétisés par des polymérases, les deux brins réparés sont séparés des brins homologues par les résolvases et la ligation finale se fait au moyen de la ligase 1.

iii. Réparation fautive par « Single Strand Annealing »

La reconnaissance de la cassure fait là aussi intervenir le complexe Rad50/Mre11/Nbs1 mais également Rad52. Après formation d'extrémités 3' libres par une exonucléase, il y a recherche et alignement de régions courtes homologues puis excision des extrémités non alignées par le complexe ERCC1/XPF [9]. L'élimination des extrémités d'ADN simple brin est dépendante du complexe Rad1/Rad10 et de la présence des protéines Msh2 et Msh3, et va induire une délétion au niveau de la cassure.

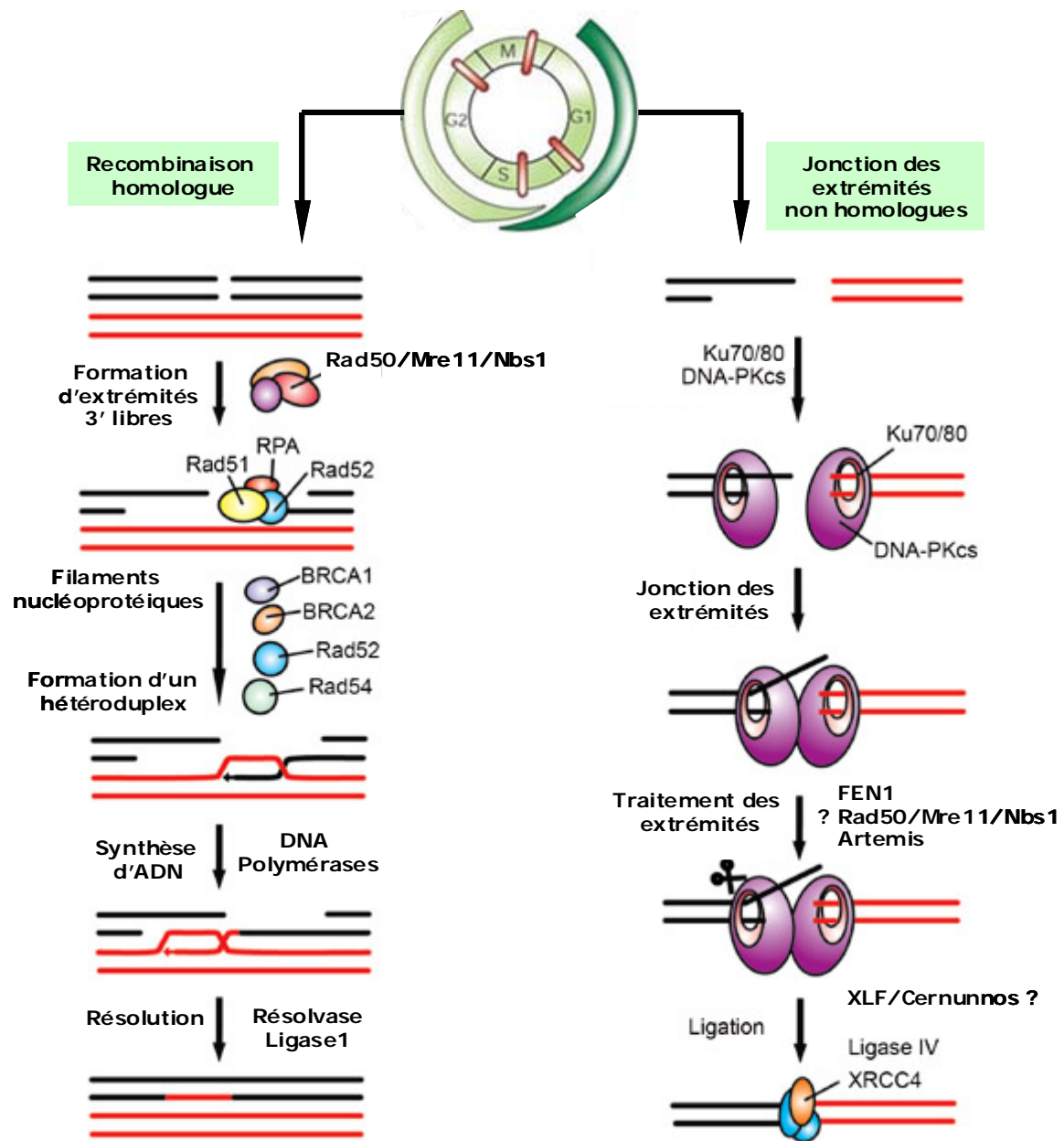


Figure 3 Mécanismes de réparation par recombinaison homologue et par jonction des extrémités non homologues (d'après Weterings et Chen [5]).

C/ Arrêt du cycle cellulaire

Il existe chez les eucaryotes plusieurs points de contrôle du cycle cellulaire permettant la vérification du bon déroulement des processus de réplication ou de mitose. En cas de dommages de l'ADN, la cellule a la capacité d'arrêter plus ou moins durablement son cycle pour permettre aux mécanismes de réparation d'agir et éviter ainsi les anomalies de réplication ou les aberrations chromosomiques qui pourraient apparaître en mitose. Les cassures double brin (CDB) et les dommages qui bloquent les fourches de réplication sont des dommages pouvant induire un arrêt du cycle cellulaire [10]. ATM et ATR qui reconnaissent les CDB et les arrêts des fourches de réplication peuvent activer les voies de transduction qui provoquent l'arrêt du cycle. La transduction du signal initiée par ATM et ATR fait intervenir les protéines kinases CHK1 et CHK2 (*checkpoint homologs*), décrites comme des adaptateurs qui vont phosphoryler les effecteurs de la réponse cellulaire. La protéine CHK2 sert préférentiellement d'adaptateur à ATM et CHK1 à ATR [11].

a) Les gènes majeurs du cycle cellulaire

i. Le gène RB1

Le gène RB1 du rétinoblastome est localisé sur le bras long du chromosome 13 humain (13q14.1) et contient 27 exons. Chez le rat, il est localisé en 15q12 et comprend 28 exons. La protéine pRb issue de ce gène est une phosphoprotéine nucléaire exprimée de façon constitutive, qui permet, en particulier, le contrôle de la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire.

Les cibles majeures de pRb sont les facteurs de transcription de la famille E2F induisant la synthèse de nombreuses protéines de réplication. En se liant au domaine de transactivation de ces facteurs, pRb peut bloquer leur capacité à activer la transcription (figure 4). La phosphorylation de pRb inactive la protéine. Cette phosphorylation est dépendante du cycle et se fait séquentiellement grâce au complexe cycline D- Cdk4/6.

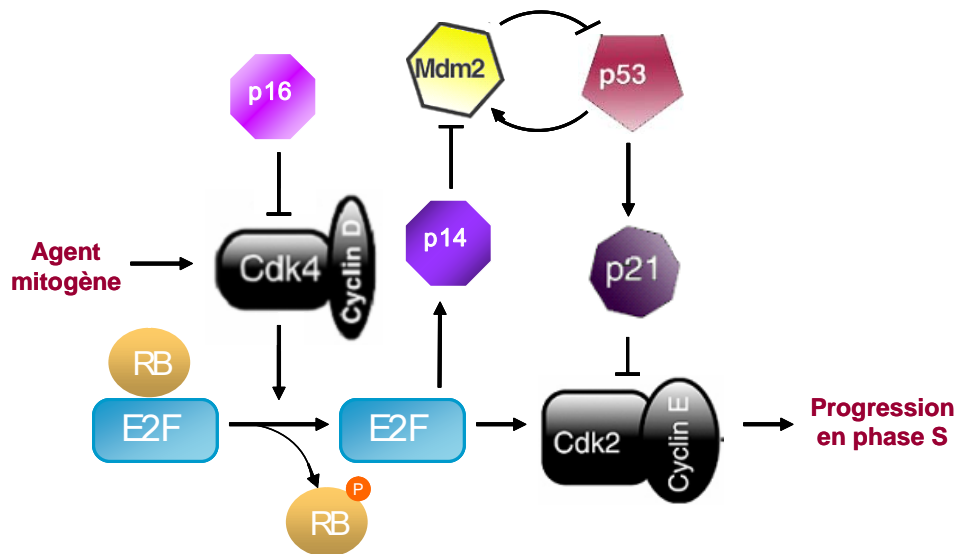


Figure 4 Régulation du cycle cellulaire par les gènes *RB1*, *p16INK4a* et *Tp53*

ii. Le gène *TP53*

Le gène suppresseur de tumeur *TP53* est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et la stabilité du génome. Il est localisé sur le bras court du chromosome 17 humain (17p13.1) et se compose de 11 exons. Chez le rat, il se trouve en 10q24 et comporte 10 exons. La protéine p53 contient quatre domaines fonctionnels majeurs (figure 5).

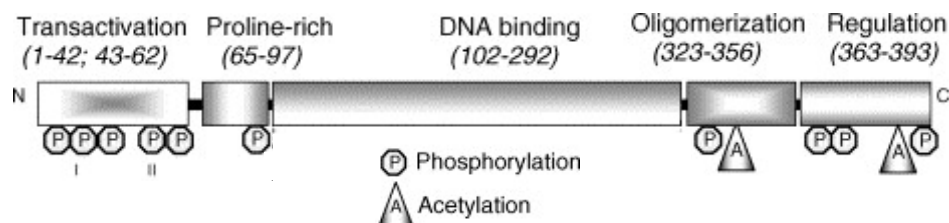


Figure 5 Structure de la protéine p53 (d'après Bouchet et coll.[12])

L'extrémité N-terminale de la protéine est le domaine de transactivation où se trouve le site de fixation de Mdm2, protéine responsable de la dégradation de p53 via l'ubiquitination. La région centrale contient le domaine de liaison à l'ADN. La partie C-terminale contient le domaine de tétramérisation de la protéine, qui facilite la fixation spécifique de p53 à l'ADN, et un domaine de régulation négative qui inhibe cette fixation spécifique. En réponse à l'activation d'oncogènes, comme Ras par exemple, la protéine est stabilisée par inactivation de Mdm2. En réponse à un stress cellulaire, *Tp53* contrôle l'arrêt du cycle en agissant comme

un facteur de transcription de nombreux gènes, dont $p21^{WAF1}$ qui inhibe la formation des complexes cycline D- Cdk4/6 et cycline E – Cdk2 (figure 4).

iii. Les gènes *p16INK4a* et *p14ARF*

Le locus CDKN2a humain est localisé sur le bras court du chromosome 9 (9p21). Chez le rat, il se trouve en 5q32. Il inclut deux gènes : *p16INK4a* et un transcrit alternatif nommé *p14ARF* chez l'homme, *p19Arf* chez le rongeur. Ils se composent de 3 exons, dont deux exons en commun (figure 6). Ils diffèrent par leur premier exon qui est désigné par *exon1 α* pour *p16INK4a* et *exon1 β* pour *p14/p19ARF*.

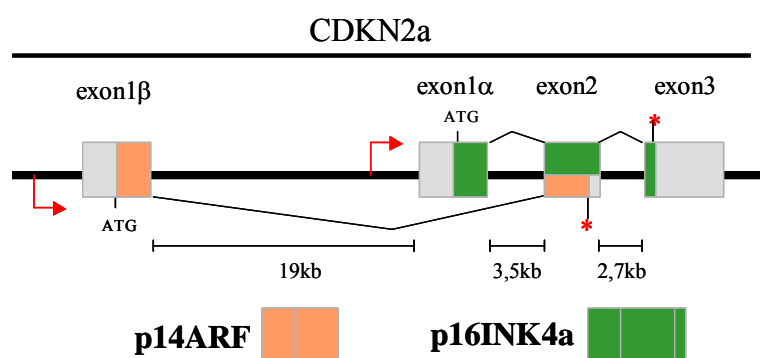


Figure 6 Structure du locus *CDKN2a* humain (d'après Gallagher et coll. [13])

La protéine $p16^{INK4a}$ appartient à la classe INK4 des inhibiteurs du cycle cellulaire et induit le blocage du cycle en phase G1 par inhibition des kinases Cdk4 et Cdk6 qui, complexées à la Cycline D, phosphorylent pRb (figure 4).

Une fois transactivé par E2F, le gène *p14ARF* favorise également l'arrêt du cycle cellulaire. La protéine $p14^{ARF}$ se fixe à Mdm2 pour lever l'inhibition de transcription du gène TP53 et empêcher l'ubiquitination de la protéine (figure 4).

b) Arrêt radio-induit du cycle en phase G1

En phase G1 du cycle cellulaire, l'arrêt consécutif à la formation de lésions de l'ADN peut concerner soit le point de restriction, soit la transition G1/S.

Pour un arrêt au niveau du point de restriction, les protéines ATM/ATR ou Chk1/Chk2 vont phosphoryler la protéine p53, ce qui va inhiber l'interaction entre p53 et son inhibiteur Mdm2 (figure 7) [14]. p53 va alors induire l'expression de $p21^{WAF1}$ qui, comme $p16^{INK4a}$, va inhiber la phosphorylation de pRB par CDK4 et CDK6. La protéine pRB non phosphorylée reste fixée à E2F, conduisant au blocage du point de restriction..

L'arrêt au niveau de la transition G1/S dépend également de ATM/ATR et met en jeu deux voies différentes. La première voie entraîne un arrêt soutenu, voire définitif du cycle et fait intervenir les protéines p53 et p21^{WAF1}. Cette dernière, inhibant le complexe cycline E-CDK2, empêche la transition G1/S. La deuxième voie est plus rapide mais transitoire car elle ne retarde la progression du cycle que pendant quelques heures. Dans ce cas, les protéines Chk1 et Chk2 phosphorylent la protéine Cdc25A ce qui entraîne son ubiquitination et sa dégradation au niveau du protéasome (figure 7) [15]. La protéine Cdc25A ne peut alors plus activer CDK2 par déphosphorylation ; il s'ensuit la phosphorylation persistante de CDK2 qui entraîne le blocage de la transition G1/S.

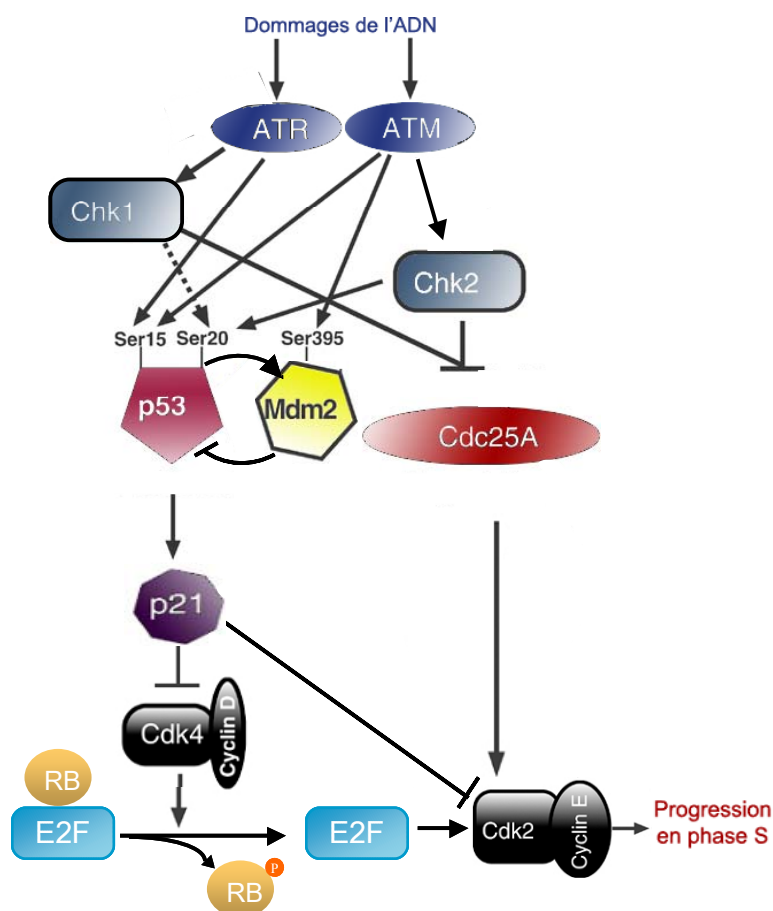


Figure 7 Contrôle du point de restriction en G1 et de la transition G1/S du cycle cellulaire suite à des dommages de l'ADN

c) Arrêt radio-induit du cycle en phase S et G2/M

En phase S, l'arrêt du cycle est également transitoire et réversible. Il y a une inhibition de l'initiation de nouveaux réplicons par la voie ATM/ATR – Chk1/Chk2 – Cdc25A – Cycline E/CDK2 [14].

Au niveau de la transition G2/M, l'initiation de la mitose est liée au complexe cycline B - Cdc2 (Cdk1) qui est phosphorylé par la kinase CAK (*Cdk activating kinase*) (figure 8). La kinase Cdc2 phosphorylée au niveau des résidus Tyrosine 15 et thréonine 14 par la tyrosine kinase Wee1 reste cependant inactive. La transition G2/M nécessite la déphosphorylation de ces résidus par Cdc25. Le blocage radio-induit en G2/M est donc lié à l'inhibition de la déphosphorylation de Cdc2, soit par suppression de l'activité Cdc25, soit par maintien de l'activité de Wee1. Ces deux régulations peuvent résulter de l'activation de Chk1 et Chk2 sous le contrôle d'ATM/ATR [15].

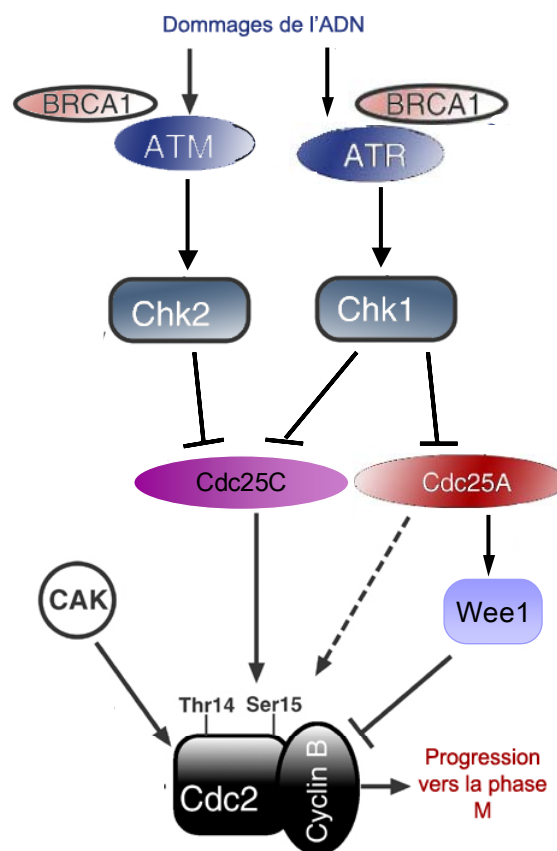


Figure 8 Contrôle de la transition G2/M du cycle cellulaire suite à des dommages de l'ADN

D/ Apoptose radio-induite par p53

Les mécanismes de la réparation et du contrôle du cycle cellulaire sont intimement liés dans le but de maintenir l'intégrité du génome. Si le nombre de dommages radio-induits de l'ADN devient trop important, la cellule peut déclencher un processus d'apoptose. Comme pour l'arrêt du cycle radio-induit, la transduction du signal est assurée par ATM/Chk2. La protéine Chk2 phosphoryle p53 qui, en retour, va activer les voies apoptotiques.

L'apoptose est un processus actif de mort programmée qui se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, on observe une fragmentation de l'ADN des nucléosomes, une protéolyse sélective faisant intervenir des caspases et une condensation de la chromatine. Ensuite, s'enclenche la phase de nécrose apoptotique au cours de laquelle la cellule perd son adhérence, la membrane cellulaire bourgeonne et le processus de lyse de l'ADN se poursuit, aboutissant à la fragmentation du noyau. La cellule se décompose alors en corps apoptotiques qui seront éliminés par les cellules avoisinantes [16].

Les caspases sont considérées comme les effecteurs clés de l'apoptose. Ce sont des protéases à cystéine qui clivent leur substrat après des résidus acides aspartiques. Il existe une quinzaine de caspases qui sont à l'état de zymogènes inactifs (procaspases) dans les cellules. Après activation, les caspases dites « initiatrices » (caspase-6, -8, -9 et -10) vont cliver et activer d'autres caspases dites « effectrices » (caspase-2, -3 et -7) pour lesquelles on dénombre plus d'une centaine de substrats. Parmi ces substrats se trouvent des protéines de structure comme l'actine G ou les lamines. Le clivage des lamines A et B par les caspases 3 et 6 induit le désassemblage de la lamine nucléaire. Les caspases ciblent également des protéines de la réparation et du cycle cellulaire comme pRB, Mdm2, PARP, Rad 51 ou DNA-PKcs et des protéines contribuant à l'inhibition de l'apoptose (Bcl-2, Bcl-x_L). L'induction des caspases consécutivement à l'activation de p53 a lieu simultanément selon plusieurs voies (figure 9) [17, 18].

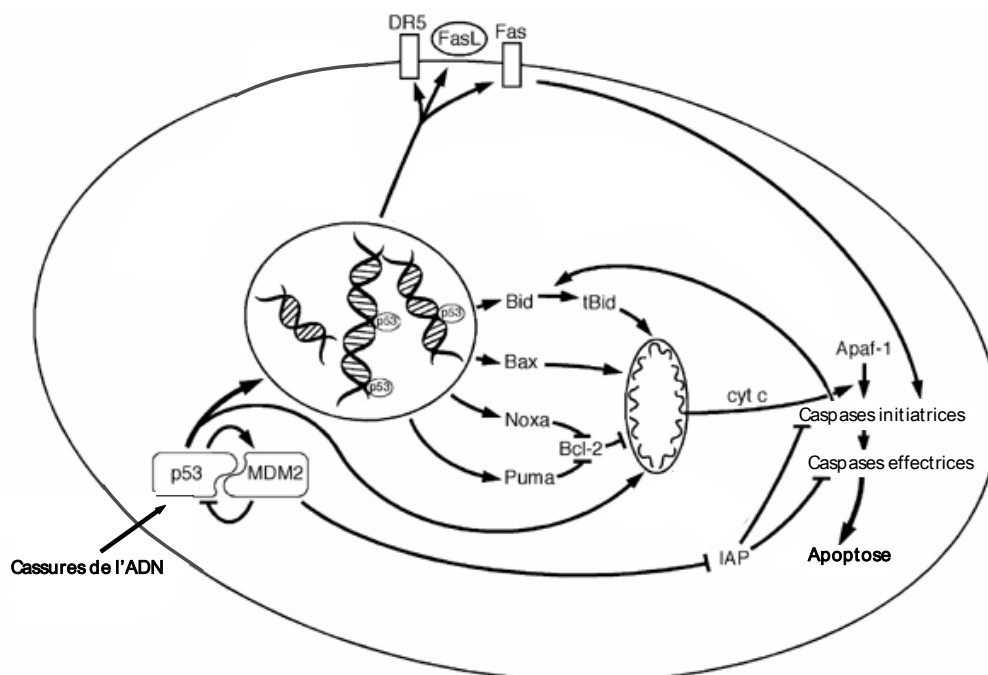


Figure 9 Voies d'induction de l'apoptose par p53 (d'après Fridman et Lowe [17])

a) Voie mitochondriale

Dans cette voie, les protéines de la famille Bcl-2 antagonistes (Bcl-2 et Bcl-XL) ou déclencheurs (BAX, Bad, Bak, Bid) de l'apoptose sont en compétition pour se fixer sur la paroi externe de la mitochondrie, contrôlant l'ouverture de ses pores et la libération de cytochrome c. Le cytochrome c libéré se fixe alors à Apaf-1 qui en retour s'agrège à d'autres molécules d'Apaf-1, générant un filament qui se fixe à la procaspase-9 pour former l'apoptosome. En présence d'ATP, la procaspase-9 s'active et clive les caspases effectrices. La protéine p53 a pour rôle d'activer la transcription de Bax et des protéines PUMA et NOXA qui inhibent Bcl-2 (figure 9). L'excès de Bax et l'inhibition de Bcl-2 déséquilibrent le rapport des deux protéines au niveau de la membrane mitochondriale et induisent l'apoptose.

b) Voie des récepteurs de mort

Il existe dans la cellule une famille de récepteurs transmembranaires capables de réguler l'activation des caspases : les récepteurs de mort qui appartiennent à la famille des récepteurs au TNF (*Tumor necrosis factor*). En présence de ligand(s) (soluble et/ou transmembranaire), ces récepteurs se trimérisent et recrutent des protéines initiatrices comme les procaspases 8 ou 10. Celles-ci peuvent alors activer les procaspases effectrices 3, 6 et 7 ou induire la voie mitochondriale de l'apoptose. Les couples ligand-récepteur pro-apoptotiques sont TNF/TNF-R1, TRAIL/DR4 ou DR5 et Fas Ligand/Fas. Cette voie d'apoptose extrinsèque peut être induite par p53 qui active directement la transcription des gènes Fas, DR5 et Fas Ligand (figure 9).

c) Inhibition des inhibiteurs de caspases

Certaines protéines, les IAP (*Inhibitor of Apoptosis*), ont la capacité d'inhiber spécifiquement l'activité de certaines caspases. La protéine p53 qui possède des propriétés de trans-répression peut inhiber la survivine, une IAP elle-même capable d'inhiber l'apoptose lorsqu'elle est sur-exprimée.

E/ Instabilité génomique radio-induite

L'instabilité génomique est définie comme une augmentation du taux d'altérations génomiques au cours de la prolifération cellulaire, qu'il s'agisse de mutations ou d'aberrations chromosomiques. Elle est considérée comme l'un des processus les plus

importants de la tumorigenèse car elle conduirait, par l'accumulation d'altérations génomiques, à l'activation d'oncogènes ou à la perte de gènes suppresseurs de tumeurs.

Une telle instabilité a été observée dans la descendance de cellules irradiées et peut se perpétuer pendant de nombreuses générations. L'instabilité génomique radio-induite est observée dans la plupart des types cellulaires et peut être induite par des radiations de TEL faible (rayonnements X et γ) ou élevé (particules α).

a) Mutations radio-induites

Plusieurs modèles ont été utilisés pour déterminer le taux et la nature des mutations apparues après irradiation à un locus donné. Une des premières études a été réalisée sur des cellules de hamster pour analyser le spectre de mutation du gène hémizygote HPRT (pour Hypoxantine Guanine Phosphoribosyl Transférase) porté par le chromosome X. Elle a montré qu'une irradiation peut induire des mutations ponctuelles (substitutions de bases, insertions/délétions d'une base), des délétions inférieures à 100 paires de bases, ainsi que des délétions plus grandes voire totales de ce gène [19]. Une autre étude majeure sur la nature des mutations radio-induites a également été menée sur des cellules lymphoblastoïdes humaines hétérozygotes pour le locus autosomal de la thymidine kinase (TK) [20]. La perte d'hétérozygotie (LOH pour *Loss of Heterozygosity*) a été l'évènement le plus fréquemment observé, pouvant s'étendre à d'autres gènes plus ou moins distants du gène cible [21]. Bien que ces LOH étaient principalement dues à des délétions chromosomiques, il a aussi été démontré qu'elles pouvaient résulter de processus de recombinaison [21, 22].

Outre les mutations observées juste après l'exposition à des rayonnements ionisants, les études de mutagenèse de HPRT ont démontré qu'environ 10 % des populations clonales, dérivées des cellules ayant survécu à une irradiation X ou alpha, présentent une augmentation significative de leur taux de mutation par rapport à des populations clonales dérivées de cellules non irradiées [23, 24]. Ce phénomène d'instabilité persiste pendant 30 à 50 générations après l'irradiation. Par ailleurs, les mutations qui apparaissent de façon retardée n'ont pas le même spectre moléculaire que celles observées juste après l'irradiation. En effet, si après irradiation les mutations sont majoritairement des délétions, celles qui apparaissent de façon retardée sont essentiellement ponctuelles et, en ce sens, ressemblent plus à des mutations spontanées [24, 25].

b) Instabilité chromosomique

Les aberrations chromosomiques radio-induites peuvent être de nature différente selon le moment du cycle où a lieu l'irradiation. Si elle a lieu avant la phase S du cycle cellulaire, elle peut provoquer des échanges intrachromosomiques (délétion, anneau centrique, inversion péricentrique) ou interchromosomiques (dicentrique et fragment, échange symétrique), aberrations qui seront portées par les deux chromatides dès la phase S suivante. Si l'irradiation a lieu en phase S ou G2, les aberrations sont chromatidiennes (lacunes, fragments) et une seule chromatide sur les deux sera touchée. Plusieurs mécanismes conduisant à la formation des aberrations chromosomiques ont été proposés mais il semble que l'évènement prépondérant soit la formation d'une cassure de chromatide suivie par la fusion des extrémités coupées. Certaines cassures ne sont pas réparées et donnent lieu à la formation de fragments. Seules les aberrations stables (translocation, inversion) seront transmises à la descendance et pourront être mises en évidence plusieurs générations cellulaires post-irradiation tandis que les aberrations instables, incompatibles avec la survie cellulaire, seront éliminées.

En terme d'instabilité chromosomique radio-induite différée, une augmentation de la fréquence des aberrations chromosomiques non clonales a été montrée pour la première fois dans des cellules souches hématopoïétiques de souris examinées 12 à 14 générations après une exposition aux rayonnements α [26]. Les aberrations chromosomiques différées observées pouvaient être chromosomiques ou chromatidiennes [24, 27]. Dans une autre étude, il a été montré que 65 % des clones provenant des lymphocytes T humains irradiés *in vitro* avaient développé une instabilité chromosomique [28]. Les aberrations observées n'affectaient pas de chromosome en particulier et se composaient principalement de translocations et de délétions de bras chromosomiques entiers, comme l'a confirmé une étude ultérieure [25].

3. Effets des radiations au niveau de l'organisme

Au niveau de l'organisme, on distingue deux types d'effets des radiations. Les effets dits « somatiques » atteignent l'individu irradié et peuvent apparaître rapidement après l'irradiation (quelques heures à quelques jours) ou plus tardivement comme dans le cas des cancers, pouvant se manifester plusieurs dizaines d'années après l'irradiation. Les effets dits « héréditaires » touchent la descendance de l'individu irradié et se manifestent par des anomalies génétiques.

Ces effets héréditaires ont été mis en évidence chez la souris [29]. Mais à ce jour, les études épidémiologiques chez l'homme (et particulièrement chez les survivants d'Hiroshima et Nagasaki) n'ont révélé aucune augmentation significative de la fréquence des anomalies génétiques dans la descendance des personnes irradiées, l'incidence naturelle des mutations héréditaires étant déjà élevée (environ 10% des naissances) [30]. C'est pourquoi nous ne développerons ici que les effets somatiques.

En fonction des doses reçues par l'organisme, on distingue à nouveau deux grands types d'effets : les déterministes et les aléatoires.

A/ Les effets déterministes

Les effets déterministes des radiations se caractérisent par des altérations prévisibles qui s'aggravent avec la dose et n'apparaissent qu'à partir d'une dose seuil dans un délai de quelques jours à quelques mois (figure 10a). Les effets déterministes dérivent essentiellement de la destruction par apoptose ou nécrose des cellules du tissu irradié.

Lors d'une irradiation externe globale inférieure à 0,5 Gy, les effets déterministes se manifestent par des modifications réversibles de la formule sanguine, liées à l'atteinte de la moelle osseuse. Pour des doses plus fortes, les effets sont irréversibles et peuvent conduire à la mort de l'individu. Ce sont des brûlures, des cataractes, des troubles digestifs, hématopoïétiques, neurologiques... Pour les très fortes doses (6 à 10 Gy), la mort de l'individu peut survenir en moins de 48 heures [31].

B/ Les effets stochastiques

Les effets somatiques stochastiques (ou aléatoires) de l'irradiation sont les cancers. Ils se caractérisent par une survenue probabiliste qui dépend de la dose, une survenue dépendante de la variabilité inter-individuelle de radiosensibilité, une gravité indépendante de la dose, et un délai d'apparition de plusieurs années après l'exposition.

Toutes les radiations ionisantes (X , γ , α , β , neutrons) sont potentiellement cancérogènes de par les dommages qu'elles peuvent causer au niveau de l'ADN. Par prudence, la CIPR considère que toute dose de radiation, aussi faible soit-elle, peut entraîner un cancer. Elle applique, aux faibles doses, une extrapolation linéaire sans seuil des risques aux fortes doses observés chez les survivants d'Hiroshima et Nagasaki (figure 10b). Cependant, aucune donnée scientifique ne permet, à l'heure actuelle, de déterminer s'il existe un risque de cancer aux faibles doses, ni, à fortiori, de définir si la relation dose-effet est linéaire jusqu'aux plus faibles doses.

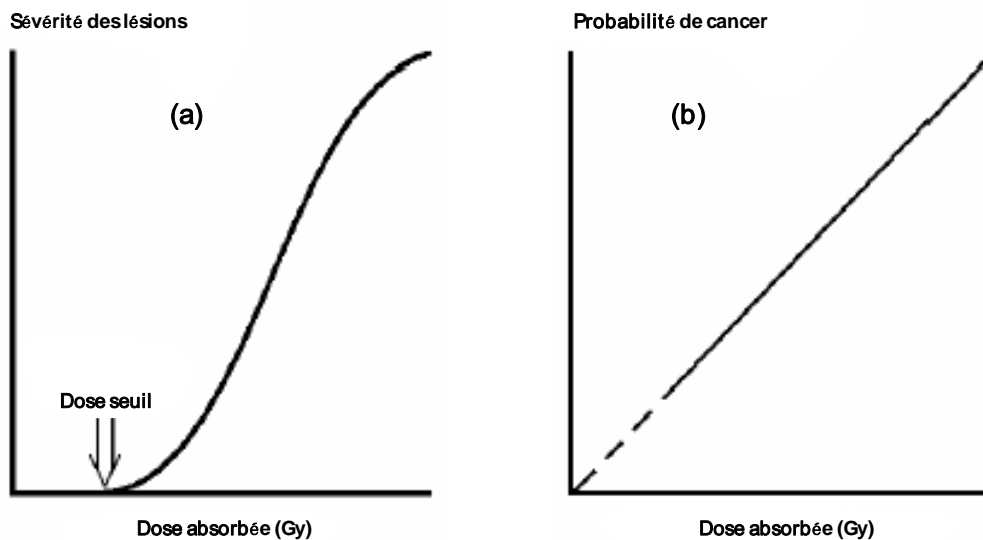


Figure 10 Relations dose-effet de l'irradiation. (a) Les effets déterministes apparaissent à partir d'une dose seuil variable selon les atteintes. La sévérité des lésions augmente avec la dose. (b) Les effets stochastiques sont supposés augmenter de manière linéaire avec la dose (d'après l'Agence internationale de l'énergie atomique IAEA [31])

4. Les cancers radio-induits chez l'homme : principales données épidémiologiques

De nombreuses études épidémiologiques ont été menées sur des cohortes d'individus exposés à différentes sources de radiations afin d'évaluer les risques de cancer pour l'homme. Dans la plupart des enquêtes épidémiologiques, le risque relatif est estimé en comparant le nombre de cancers observés (O) dans une population exposée avec le nombre de cancers attendus (E), observés dans une population témoin non exposée. Le risque relatif (RR) s'exprime comme suit :

$$RR = O / E$$

Dans une optique de modélisation, l'excès de risque relatif (ERR) est ensuite défini par :

$$ERR = RR - 1$$

Nous proposons ici de présenter les principales études sur l'induction de cancers radio-induits menées chez l'homme après expositions militaires, accidentelles, professionnelles ou naturelles. Chacune de ces études a apporté, avec ses limites, des informations utiles à une meilleure évaluation des risques de cancer après irradiation.

A/ Les expositions militaires ou accidentelles

a) Les survivants d'Hiroshima et de Nagasaki

L'explosion des deux bombes atomiques à Hiroshima et Nagasaki en août 1945 provoqua une irradiation aiguë « corps entier » à très fort débit de dose de milliers de civils japonais. Cette irradiation impliqua essentiellement des rayonnements γ et plus accessoirement des neutrons. Les doses absorbées reçues par la population se sont étendues de 0,01 à 5 Gy. Parmi les survivants de ces explosions, 105 427 individus ont été régulièrement suivis jusqu'à nos jours (*Life Span Study*). Entre 1950 et 1990, 7578 décès par tumeurs solides ont été dénombrés chez les sujets irradiés à plus de 0,5 Gy, parmi lesquels 334 décès imputables aux radiations si l'on considère les 7244 décès par tumeurs solides observés dans un groupe de témoins irradiés à moins de 0,01 Gy. De la même manière, 87 des 249 décès par leucémie survenus pendant la même période ont pu être attribués à l'exposition aux radiations ionisantes (rapport UNSCEAR 2000). Ces premières données portent sur la mortalité par cancer. L'étude de l'incidence des cancers radio-induits prend également en compte les cancers n'aboutissant que rarement à la mort, tels que les cancers de la thyroïde, dont la guérison est fréquente. Entre 1950 et 1987, pour l'ensemble des tumeurs solides, l'ERR estimé à 1 Sv est de 0,45 pour la mortalité contre 0,63 pour l'incidence, soit une différence de 40 % [32].

Les radiations ionisantes ont été responsables d'une augmentation significative de l'incidence de plusieurs types de tumeurs solides : les cancers du colon (ERR = 0,72) et de la peau (ERR = 1) qui sont des tissus très radiosensibles, mais aussi les cancers de l'estomac (ERR = 0,32), du foie (ERR = 0,49), du poumon (ERR = 0,95), des ovaires (ERR = 0,99), de la vessie (ERR = 1,02), de la thyroïde (ERR = 1,15) et du sein (ERR = 1,59) [33]. La relation entre la dose et le risque de cancers solides, tous types confondus, est linéaire [34]. Concernant les leucémies, aucun excès de risque n'a été observé pour les leucémies à cellules T et les leucémies lymphoïdes chroniques (qui représentent un très petit nombre de cas dans la cohorte étudiée). Pour les leucémies lymphoblastiques aiguës, les leucémies myéloïdes chroniques et les leucémies myéloïdes aiguës, les excès de risque relatifs sont de 9,1, 6,2 et 3,3 respectivement [35]. Ces risques apparaissent comme étant les plus élevés parmi tous les cancers radio-induits développés par les survivants des deux bombes atomiques. La relation dose-effet pour les leucémies suit également une fonction linéaire [35].

La cohorte japonaise constitue la source d'information la plus importante dont on dispose sur les effets différés d'une exposition à une irradiation externe. Cependant, les doses

reçues étant le plus souvent fortes et aiguës, elles ne permettent pas d'apprécier ni les risques liés aux faibles doses ni ceux liés à une exposition chronique. Par ailleurs, la contribution des neutrons à la dose totale ainsi que les possibles effets mécaniques ou thermiques dus aux blessures constituent des facteurs d'incertitude.

b) L'accident de Tchernobyl

Le 26 avril 1986, l'explosion d'un des réacteurs de la centrale nucléaire de Tchernobyl en Ukraine a provoqué la libération massive de matières radioactives dans l'atmosphère. Les éléments les plus représentés étaient deux des isotopes radioactifs de l'iode : I^{131} et I^{133} , et du césium : Cs^{137} et Cs^{134} . D'un point de vue radiobiologique, le Cs^{137} et l' I^{131} , émetteurs β et γ essentiellement, sont les radionucléides qui, étant les plus volatiles, ont majoritairement contribué à l'irradiation de la population dans un large périmètre autour de la centrale. Une contamination de surface au Cs^{137} , supérieure à 3700 kBq/m^2 , a été retrouvée en Biélorussie, dans la Fédération russe et en Ukraine. La plupart des personnes irradiées ont donc été soumises à la fois à une irradiation externe, par les radioéléments libérés dans l'environnement, et à une irradiation interne par contamination alimentaire. L'iode est un oligo-élément utilisé exclusivement par la glande thyroïde pour la synthèse des hormones thyroïdiennes. Une carence en iode dans la population exposée a provoqué la fixation massive d'iode radioactif sur la thyroïde. L' I^{131} , qui a une demi-vie de 8 jours, a ainsi contribué à la quasi-totalité de la dose reçue par cette glande pendant les premières semaines qui ont suivi l'accident. Quant au Cs^{137} qui contamine encore aujourd'hui les sols et l'eau, il est le radionucléide qui a majoritairement contribué aux doses reçues par les autres organes, que ce soit par irradiation interne ou externe. Pendant plusieurs décennies, le Cs^{137} dont la demi-vie est de 30 ans, continuera d'irradier, à faibles doses, les populations des trois pays touchés par l'accident.

La conséquence majeure de cet accident a été une augmentation significative des cancers de la thyroïde chez les enfants. Ceux-ci semblaient souffrir d'une carence en iode plus marquée que chez les adultes qui aurait provoqué une sur-fixation d'iode radioactif sur la thyroïde. De plus, le risque de développer un cancer radio-induit est d'autant plus élevé que les sujets irradiés sont jeunes, l'organisme étant plus radiosensible au cours du développement. La dose absorbée moyenne à la thyroïde chez les enfants de moins de 8 ans évacués, dans un rayon de 30 km autour de la centrale, a varié de 0,97 à 3,1 Gy tandis que les doses chez les adultes n'ont pas dépassé 0,7 Gy [36]. En Biélorussie, en Ukraine et en Russie, entre 1992 et 2002, plus de 4000 cancers de la thyroïde ont été diagnostiqués chez des

personnes irradiées avant l'âge de 18 ans [36]. En tenant compte de l'imprécision des calculs, due au manque de recensement antérieur des cancers spontanés de la thyroïde, ce nombre de cancers reste quatre fois plus élevé que celui estimé suite à l'accident (rapport UNSCEAR 2000) [37]. Une des explications de cette différence est liée à l'incertitude de la dose délivrée par les autres radio-isotopes de l'iode à courte durée de vie : I^{133} , I^{134} et I^{135} . D'autre part, la carence en iode de la population qui aurait pu entraîner une sur-fixation de l'iode radioactif par la thyroïde n'a pas été prise en compte dans les premières estimations. Enfin, s'ajoutent les effets de l'irradiation interne et externe par le Cs^{137} , irradiation qui n'a pas été incluse dans la reconstitution de la dose délivrée à la thyroïde. Or, un ERR de 7,7 par Gy a été observé pour l'incidence des cancers de la thyroïde chez des personnes exposées avant 15 ans à des radiations externes X ou γ [38]. Même si le Cs^{137} n'est responsable que d'une petite fraction de la dose délivrée à la thyroïde et que l'estimation du risque de cancer est rendue difficile devant l'impact majeur de l'iode radioactif, ce radio-élément a également pu contribuer au développement des tumeurs de la thyroïde chez les enfants. Contrairement aux données japonaises, la relation entre la dose et le risque de cancer est de type linéaire-quadratique avec une inflexion pour des doses supérieures à 2 Gy [39]. Cette différence peut être expliquée par de possibles biais dans l'estimation de la dose reçue à la thyroïde ou par le nombre restreint de sujets exposés à des doses supérieures à 2 Gy.

Chez les personnes adultes habitant les régions les plus contaminées, aucune augmentation significative du risque de cancer de la thyroïde n'a été trouvée pour une dose moyenne à la thyroïde estimée à 7 mGy (rapport UNSCEAR 2000). Enfin, aucune corrélation entre les cancers de la thyroïde et les doses d'irradiation externe reçues n'a été observée chez les « liquidateurs » qui ont travaillé autour du réacteur entre 1986 et 1987 [40, 41].

Des études épidémiologiques ont montré une augmentation de l'incidence des leucémies chez les personnes des régions les plus contaminées et chez les travailleurs, mais ces augmentations n'ont jamais pu être associées aux doses d'irradiation [36, 42]. Les leucémies ont été fortement associées à l'exposition aux rayonnements ionisants dans la cohorte des survivants d'Hiroshima et Nagasaki. Cette différence entre les cohortes russes et japonaises pourrait être due à la différence de dose et de débit de dose. En effet, tandis que la population japonaise a été exposée à des doses flash de 10 à 500 mGy, les liquidateurs ont reçu une dose de 100 mGy en moyenne sur un an et la population accidentée de Tchernobyl a reçu une dose cumulée de 50 mGy sur 20 ans dans les régions les plus contaminées [36].

Concernant les tumeurs solides autres que les cancers de la thyroïde, aucune augmentation significative de leur incidence n'a été mise en évidence que ce soit chez les liquidateurs [43]

ou chez les résidents des régions contaminées [36, 44]. Les doses reçues par les organes autres que la thyroïde sont relativement faibles et seule une petite augmentation du risque de cancer est attendue ou s'est déjà produite qui est, ou sera, difficile à discerner de la fréquence de cancer de base du fait des limites statistiques des études épidémiologiques.

B/ L'exposition industrielle

Le complexe nucléaire industriel de Mayak, ouvert en 1948 dans le sud de l'Oural, fut le premier et le plus grand site de fabrication d'armes nucléaires de l'ex-Union soviétique. Des milliers de personnes employées ont pu être exposées de manière combinée, selon leur poste de travail, à une irradiation externe γ et à une irradiation interne α suite à l'inhalation de plutonium. Les effets de ces irradiations chroniques et fractionnées ont fait l'objet d'une étude sur une cohorte de 21 550 personnes embauchées entre 1948 et 1972, ayant reçu une dose externe cumulée moyenne de 0,8 Gy [45]. Une reconstitution de la dose interne cumulée moyenne au poumon, basée sur l'historique professionnel des travailleurs de cette cohorte, a permis d'estimer cette dose à 0,18 Gy. Pendant cette période, 1730 décès par tumeurs solides ont été dénombrés dont 440 imputables aux cancers radio-induits. De la même manière, 26 des 66 décès par leucémie ont été associés aux radiations ionisantes.

Les tumeurs solides possiblement radio-induites incluent 304 cancers (70 %) ciblant les organes qui fixent préférentiellement le plutonium (poumon, foie et squelette). Ces cancers sont donc majoritairement associés à l'irradiation interne. Pour ces tumeurs, une relation linéaire-quadratique est proposée avec une fonction linéaire jusqu'à 1,5 Gy et un ERR de mortalité de 0,54 par Gy. Cependant, ces données doivent être interprétées avec précaution car si la reconstitution de la dose interne a permis d'estimer le nombre de cancers possiblement radio-induits et de mettre en évidence une relation dose-effet, elle ne permet pas de quantifier avec exactitude le risque de cancer associé spécifiquement à l'exposition au plutonium. Une étude plus récente, basée sur une estimation des doses internes à partir de la concentration en plutonium dans les urines et/ou dans différents organes à l'autopsie, révèle que la relation dose-effet est plutôt de type linéaire pour les cancers du poumon et du foie [46]. Ces données contradictoires soulignent l'importance du calcul dans l'estimation de la dose reçue, qui représente une des limites majeures des études épidémiologiques en général.

La majorité des autres tumeurs solides radio-induites sont imputables à l'exposition externe aux rayonnements γ [45]. La relation entre la dose et le risque de mortalité par cancer est de type linéaire-quadratique avec une fonction linéaire jusqu'à 1 Gy et un ERR de mortalité de 0,21 par Gy. Ces données sont en contradiction avec la relation linéaire observée chez les

survivants d'Hiroshima et Nagasaki exposés à de fortes doses d'irradiation externe. La forme concave de la relation pour les plus fortes doses pourrait ici s'expliquer par une sur-estimation des fortes doses γ liée à l'impact possible des particules β de haute énergie enregistrées par les dosimètres aux postes de travail [47].

Les leucémies radio-induites sont imputables dans 95 % des cas aux irradiations externes avec un ERR de mortalité égal à 1. La relation dose-effet est linéaire et comparable à celle obtenue pour les survivants des bombes atomiques.

C/ L'exposition professionnelle et domestique au radon

a) Données sur le radon

Dans son environnement, l'homme peut subir une contamination radiologique après inhalation d'un gaz radioactif inodore et incolore : le radon. Ce descendant d'éléments radioactifs renfermés dans les roches et minéraux de l'écorce terrestre, se dégage plus particulièrement des roches granitiques et volcaniques. Dans les habitations, la concentration en radon varie en fonction des systèmes d'aération, ainsi que des matériaux de construction employés. Cette concentration est relativement plus élevée dans les habitations de l'Ouest et du centre de la France où elle peut atteindre jusqu'à 2000 Bq/m³. Dans les mines souterraines de minerais (étain, fer, uranium), des concentrations encore plus élevées (10 000 Bq/m³) pouvaient être rencontrées avant que la ventilation des galeries ne devienne obligatoire en 1960. A l'heure actuelle, la CIPR recommande des concentrations maximales de 600 Bq/m³ dans les habitations et de 1500 Bq/m³ dans les mines [48]. En moyenne, pour la population française, l'inhalation de radon contribuerait pour plus d'un tiers à la dose d'irradiation globale annuelle d'origine naturelle et artificielle (soit 1,4 mSv pour une dose totale d'environ 3,3 mSv par an et par personne en moyenne) (figure 11) [49].

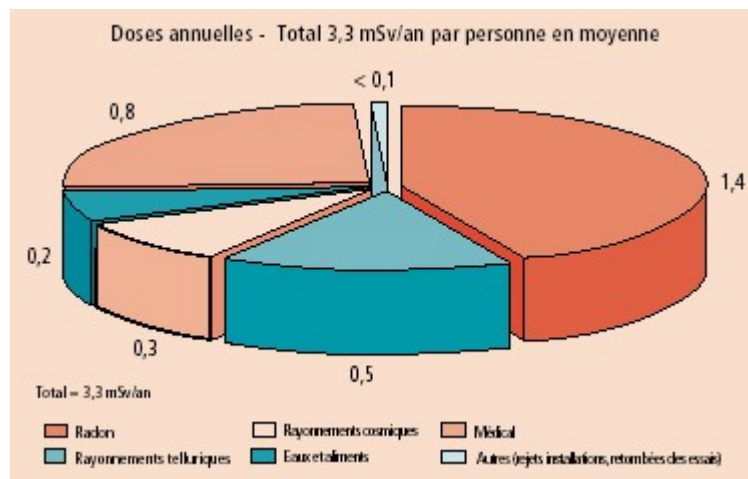


Figure 11 Exposition aux rayonnements ionisants de la population en France. Estimation en 2005 (source : Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire IRSN, d'après Godet et coll. [49])

Trois isotopes du radon sont retrouvés dans l'atmosphère :

- le radon-222, produit de filiation de l'uranium-238, issu de la désintégration du radium-226,
- le radon-220, produit de filiation du thorium-232, issu de la désintégration du radium-224 et
- le radon-219, produit de filiation de l'uranium-235, issu de la désintégration du radium-223.

Comparativement aux autres isotopes, le Rn^{222} est celui qui représente, avec ses descendants, le plus grand risque sanitaire. En effet, lors de la désintégration de cet isotope, 2 particules α très énergétiques sont émises (figure 12). Le radon et ses produits de filiation se fixent sur les particules de l'aérosol atmosphérique et peuvent pénétrer, selon la taille des particules, jusque dans le poumon profond [50]. Ils sont donc responsables d'une irradiation interne essentiellement limitée aux tissus du tractus respiratoire, induisant un risque d'apparition de tumeur pulmonaire. Le radon a été classé « cancérogène certain pour l'homme » en 1988 par le CIRC (Centre international de Recherche sur le Cancer) [51].

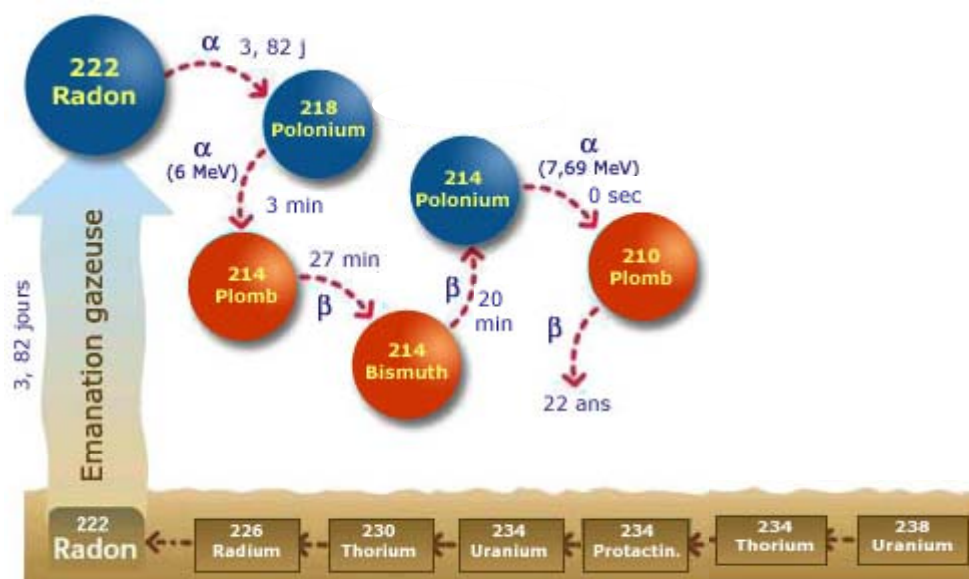


Figure 12 : Schéma de désintégration du Rn^{222}

La quantification de l'exposition radiologique au radon et à ses descendants est délicate car l'exposition résulte des concentrations respectives de ces différents radionucléides dans l'aérosol inhalé. Pour des raisons pratiques, une unité spécifique a été mise en place pour suivre l'exposition professionnelle dans les mines d'uranium, et a été ensuite adaptée aux expositions environnementales (habitations). Un *Working Level Month* (WLM) correspond à une exposition, pendant 170h, dans une atmosphère où la concentration en énergie potentielle alpha des descendants du radon est de 1 WL (1 WL ou *Working Level* est équivalent à $1,3 \cdot 10^8$ MeV par m^3 d'air ou $3700 \text{ Bq}/m^3$). Selon l'estimation de la CIPR 65, une année passée dans une maison à $230 \text{ Bq}/m^3$ correspond à un WLM si l'on y passe 80% de son temps [48]. Un WLM est estimé entre 0,8 et 10 mGy. Il est donc équivalent, en moyenne, à une dose engagée de 5 mGy sur la vie de l'individu [52, 53]. Même pour les plus forts niveaux d'exposition, qui sont rencontrés dans les mines d'uranium, les doses efficaces reçues en moyenne par les travailleurs sont de l'ordre de centaines de mGy et n'induisent pas d'effet déterministe. Pour cette raison, toutes les études chargées de définir les implications sanitaires pour l'homme de l'exposition au radon se sont spécifiquement intéressées à l'évaluation du risque de cancer du poumon aussi bien dans des conditions professionnelles (mines) que domestiques (habitations).

b) Etudes de cohortes de mineurs

Contrairement aux précédentes études basées sur des estimations de dose, des données précises d'exposition individuelle sont souvent disponibles pour les cohortes de mineurs. Une analyse internationale a été effectuée dans les années 1990 réunissant 11 cohortes, soit près de 65 000 mineurs [54-56] exposés en moyenne à 158 WLM (0,8 Gy). Dans cette analyse, 2597 décès par cancer pulmonaire ont été recensés contre 109 décès enregistrés dans une population non exposée. Ces données mettent en évidence une association certaine entre l'augmentation du risque de décès par cancer du poumon et l'exposition cumulée au radon durant la vie professionnelle. La relation dose-effet est linéaire et a permis d'évaluer un ERR de mortalité de 1 pour 200 WLM (1 Gy). Ces résultats tendent à renforcer l'étude menée chez les travailleurs de Mayak qui propose une relation linéaire entre le risque de mort par cancer du poumon et l'irradiation interne α par le plutonium. Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec précaution car l'air minier peut être contaminé par plusieurs autres carcinogènes avérés ou suspectés tels que l'arsenic, la silice ou les particules de diesel, souvent mal documentés dans la plupart des cohortes et dont les effets sont difficilement dissociables des effets du radon.

En dehors du risque de cancer du poumon, aucun autre risque de cancer solide ou de leucémie n'est associé à l'exposition cumulée au radon [57-59].

c) Etudes cas-témoins dans la population générale

La population exposée au radon domestique est soumise à de faibles doses de radon, de l'ordre du WLM (5 mGy). Si l'extrapolation aux faibles doses de la relation dose-effet linéaire obtenue chez les mineurs est théoriquement appliquée, il existe un risque potentiel de cancer du poumon dans cette population. Cependant, cette extrapolation théorique est délicate car les doses et débits de doses entre les mineurs et la population civile sont très différentes : chez les mineurs, l'exposition à une forte concentration en radon ($>2000 \text{ Bq/m}^3$) ne dure que quelques années, ce qui ne correspond pas aux conditions d'exposition domestique où la population est exposée toute sa vie à des concentrations en radon de quelques centaines de becquerel par m^3 .

Une analyse a été menée sur 13 cohortes européennes exposées à une concentration en radon domestique moyenne de 104 Bq/m^3 sur 23 ans (environ 10 WLM équivalent à 50 mGy). Elle inclut 7148 individus atteints d'un cancer du poumon et 14 208 témoins [60]. La relation dose-effet semble être linéaire sans seuil avec un ERR de 0,16 par accroissement de 100

Bq/m³. La fonction linéaire reste significative lorsque l'analyse se limite aux individus occupant des habitations où la concentration en radon est inférieure à 200 Bq/m³ (soit, sur 23 ans, 20 WLM ou 0,1 Gy). Ces données tendent à renforcer l'hypothèse d'une possible extrapolation de la relation dose-effet linéaire obtenue chez les mineurs aux plus faibles doses qui affectent la population générale. Mais cette étude doit, une nouvelle fois, être interprétée avec précaution. Les données sont basées sur des concentrations en radon « habituelles » estimées à partir de valeurs mesurées à un temps donné. Ces estimations sont approximatives car des mesures de radon réalisées dans une même habitation à quelques années d'intervalle ont montré une variabilité aléatoire importante. Cependant, à l'heure actuelle, les données sur la variabilité des mesures répétitives dans une habitation sur plusieurs années sont trop limitées pour être prises en compte.

D/ Limites des études épidémiologiques

Les études épidémiologiques ont permis de mettre en évidence un effet certain des radiations ionisantes sur le risque de cancer chez l'homme, que ce soit pour les tumeurs solides ou les leucémies. Mais, quelque soit le type d'étude, la détermination précise de la relation dose-effet est potentiellement biaisée par de multiples paramètres. C'est le cas des facteurs confondants, susceptibles d'intervenir dans le développement des tumeurs comme, par exemple, la fumée de cigarette largement répandue dans la plupart des cohortes. Le mode de vie des individus ou les conditions de travail dans les cohortes de travailleurs sont également des variables difficiles à évaluer.

De plus, dans la plupart des études, il n'existe pas de relevé dosimétrique précis et individuel. Les estimations de doses utilisées ne permettent pas de prendre en compte les variations de dose inter-individuelles, ni de définir, le cas échéant, l'impact précis des différents types de rayonnements en présence.

Enfin, l'excès de risque de cancer aux faibles doses est difficile à valider par des études épidémiologiques car ce risque, s'il existe, devrait être d'autant plus faible que la dose approche du niveau de radioactivité naturelle. A ces doses, le suivi de cohortes, même de plusieurs centaines de milliers de sujets, n'aura sans doute pas la puissance statistique suffisante pour mettre en évidence un excès d'incidence ou de mortalité très petit venant s'additionner à une incidence de cancer qui est très grande dans les populations non irradiées.

5. Apport de l'expérimentation animale pour l'évaluation du risque de cancer du poumon après inhalation de particules α

Les travaux basés sur l'exposition d'animaux de laboratoires à des rayonnements ionisants constituent une approche complémentaire à l'analyse épidémiologique pour l'étude du risque de cancer après irradiation. Contrairement aux approches épidémiologiques confrontées à un certain nombre d'incertitudes inhérentes aux estimations de doses et aux facteurs confondants, les études basées sur l'expérimentation animale peuvent être réalisées dans des conditions d'exposition rigoureusement définies. En particulier, l'étude des cancers pulmonaires radio-induits est facilitée chez l'animal par l'absence d'exposition à la fumée de cigarette. Dans le cas précis d'expositions à des carcinogènes pulmonaires, le rat semble être le modèle animal le plus adapté car il développe rarement des tumeurs pulmonaires spontanées.

L'expérimentation animale a permis d'établir que l'effet biologique majeur de l'inhalation de particules α (radon, plutonium) est l'induction de tumeurs pulmonaires. L'incidence de ces tumeurs augmente de 5 à 20 % chez des rats exposés à une gamme de dose cumulée en radon de 200 à 3200 WLM (1 à 16 Gy) par rapport à des rats non exposés [61]. Ces résultats permettent de confirmer la propriété carcinogène du radon mise en évidence par les études épidémiologiques et montre que les excès de risque de cancer observés dépendent de la dose d'exposition cumulée au radon. Par ailleurs, une augmentation de la mort par cancer du poumon chez des rats exposés à des aérosols de $^{239}\text{PuO}_2$ a été mise en évidence pour des doses variant de 0,05 à 10,5 Gy [62]. Dans une gamme de dose plus large (0,05 à 50 Gy), une augmentation du risque de tumeurs pulmonaires de 2 par Gy a également été mise en évidence après exposition à du PuO_2 industriel [63].

Le modèle de rat permet également de modéliser la relation dose-effet des rayonnements α sans qu'aucun facteur confondant n'influence cette relation. Des études ont été menées à la fin des années 1990 chez des rats exposés à du radon ou à du plutonium. La relation entre la dose de radon délivrée aux poumons et l'induction de tumeurs pulmonaires pour des niveaux d'exposition de 25, 50, 200 et 500 WLM (0,1 à 2,5 Gy) a une forme linéaire sans seuil [64] et semble confirmer les données obtenues chez l'homme. Par contre, l'incidence des cancers pulmonaires chez le rat après inhalation de $^{239}\text{PuO}_2$ est significativement augmentée à partir d'une dose seuil de 1 Gy [65], en contradiction avec les

relations dose-effet linéaires ou linéaires-quadratiques sans seuil décrites chez les travailleurs de Mayak [45, 46]. Cette différence pourrait s'expliquer par l'absence, chez le rat, de paramètres confondants présents chez l'homme tels que le tabagisme ou l'exposition à plusieurs types de rayonnements ionisants (γ et α).

Les conditions d'exposition de l'animal aux radioéléments pouvant être parfaitement contrôlées, il est possible d'analyser l'influence du débit de dose sur le risque de cancer. Les données expérimentales chez le rat après une exposition à fortes doses de radon (1000 WLM, soit environ 5 Gy) indiquent une diminution du risque de cancer pulmonaire avec l'augmentation du débit de dose (de 250 à 2000 WL) [61]. A ce niveau de doses, il est possible que l'augmentation du débit de dose, provoquant une augmentation du nombre de dommages simultanés de l'ADN dans une cellule, puisse mener à la saturation des mécanismes de réparation de l'ADN qui ne parviendraient plus à éliminer les altérations, aboutissant à la mort par apoptose des cellules lésées. Ces données suggèrent donc que le risque de cancer du poumon associé au radon résulte d'une interaction complexe entre plusieurs paramètres comprenant au moins la dose cumulée et le débit de dose. Très peu d'études de ce type ont été menées avec d'autres radioéléments. Seule une étude chez le rat après exposition à des poussières de minerai d'uranium, à des doses de 0,87 et 1,64 Gy, permet également de constater que le risque de cancer pulmonaire n'est pas directement fonction de la dose, mais qu'il dépend aussi du débit de dose [66].

Les données expérimentales viennent compléter et préciser les données épidémiologiques sur les risques de cancer pulmonaire après inhalation de radioéléments émetteurs α . Cependant, l'extrapolation à l'homme reste délicate car les mécanismes de la carcinogenèse pulmonaire chez le rat sont encore peu connus et demandent à être mieux définis pour pouvoir être utilisés comme modèle.

II. Nature histologique des cancers pulmonaires

1. Cancers du poumon chez l'homme

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer du poumon est la forme la plus fréquente de cancer dans le monde avec 1 million deux cent mille nouveaux cas par an, représentant environ 13 % des cancers diagnostiqués chez l'homme. En Europe, 386 300 nouveaux cas de cancer du poumon ont été diagnostiqués en 2006 [67]. Près de 60 % des patients atteints du cancer du poumon décèdent dans l'année suivant le diagnostic et 75 % dans les deux ans. En Europe, le cancer du poumon est le cancer le plus mortel chez l'homme et le troisième plus mortel chez la femme après les cancers du sein et du colon/rectum [67]. Environ 85 % des cancers du poumon sont la conséquence de la consommation de tabac. Parce que l'implication du tabagisme est manifeste, la plupart des études négligent souvent les effets potentiels d'autres facteurs de risque tels que le radon.

La classification histologique des tumeurs du poumon est basée sur une nomenclature dont les termes ont été établis en 1967 et réactualisés en 1999 par l'OMS. La grande majorité des cancers du poumon sont des carcinomes, c'est-à-dire des cancers issus de la transformation maligne de cellules épithéliales. Pour la classification de ces tumeurs, une distinction majeure est faite entre les tumeurs bénignes et malignes sur la base de leur caractère invasif (tableau 2) [68]. Les carcinomes pulmonaires malins se divisent en deux principaux types : les carcinomes bronchiques à petites cellules (CBPC) et les carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC). Ces derniers se divisent en trois principales catégories: les carcinomes épidermoïdes ou squameux (Sq), les adénocarcinomes (AC,) et les carcinomes à grandes cellules (CPGC).

Tumeurs pulmonaires épithéliales	
<u>Tumeurs bénignes</u>	Papillome* Adénome*
<u>Tumeurs malignes</u>	Carcinome épidermoïde. Variantes : Papillaire A cellules claires A petites cellules Basaloïde Carcinome à petites cellules. Variante : Carcinome à petites cellules composite Adénocarcinome Acineux Papillaire Bronchiolo-alvéolaire* Adénocarcinome solide à sécrétion mucineuse Mixtes Variantes* Carcinome à grande cellule* Carcinome adénoquameux Carcinome pléomorphe, sarcomatoïde ou avec éléments sarcomateux* Tumeur carcinoïde* Carcinome de type glandes salivaires* Carcinomes inclassables

*niveaux de classification supplémentaires non rapportés dans ce tableau

Tableau 2 Classification histologique des tumeurs pulmonaires épithéliales (source : OMS)

A/ Les carcinomes bronchiques à petites cellules

Le cancer bronchique à petites cellules représente environ 25 à 30 % des cancers pulmonaires et fait partie des tumeurs neuroendocrines. Il se caractérise par sa capacité à sécréter de nombreux peptides (énolase neurone-spécifique ou NSE, chromogranine A, synaptophysine, *gastrin-releasing peptide*...) qui conduisent à l'apparition de syndromes paranéoplasiques systémiques. Le CBPC est depuis longtemps considéré comme provenant du neuro-ectoderme, l'un des trois feuillets primitifs de l'embryon donnant le revêtement cutané et le système nerveux. Deux théories tentent d'expliquer cette origine. Au sein de l'épithélium bronchique, les cellules basales, les cellules à mucus, les cellules de Clara, les pneumocytes de type II et les cellules de Kultschitzky-Masson sont les cinq types de cellules susceptibles de se diviser et parmi elles, seule la cellule de Kultschitzky appartient au système neuroendocrine. Elle serait ainsi, pour certains, à l'origine du cancer bronchique à petites cellules [69]. Une autre théorie de la cellule souche pluripotente semble s'imposer actuellement. Elle considère que les cellules composant la muqueuse bronchique ont toutes

une origine commune endodermique [70]. Elles dériveraient d'une cellule souche bronchique phénotypiquement multipotente. La « cellule de CBPC » représenterait la version transformée d'une cellule engagée dans une voie de différenciation neuroendocrine dérivant de cette cellule souche. Sur cette base, on pourrait expliquer pourquoi il est possible de retrouver dans un CBPC, outre les marqueurs neuroendocrines, des marqueurs de différenciation épidermoïde et/ou glandulaire. Inversement, on pourrait également expliquer comment certains cancers bronchiques épidermoïdes ou glandulaires expriment des marqueurs neuroendocrines.

Le CBPC diffère des autres cancers pulmonaires par l'aspect en « grain d'avoine » de ses cellules. De plus, il se développe beaucoup plus rapidement que les autres types de carcinomes pulmonaires et dans plus de 60 % des cas, il a déjà métastasé dans d'autres parties du corps au moment du diagnostic. La chirurgie n'est appropriée que dans 2 à 5 % des cas, quand la tumeur diagnostiquée est de petite taille. Cette tumeur est très sensible aux premiers traitements de chimiothérapie et de radiothérapie mais devient très vite résistante et près de 95 % des patients meurent des suites du cancer. Ce type de cancer est associé dans 95 % des cas à un terrain tabagique. Il peut être retrouvé dans un contexte d'exposition interne aux rayonnements α . Il ne représente que 8 % des cas de cancers pulmonaires associés à l'incorporation de plutonium chez les travailleurs de Mayak [71]. En revanche, dans les études de cohortes de mineurs d'uranium allemands, il est fortement associé à l'exposition au radon [72]. Cette différence peut s'expliquer par une part plus importante d'hommes fumeurs dans la cohorte allemande que dans la cohorte russe qui inclut de nombreuses femmes non-fumeuses. Cette différence pourrait également provenir de la présence de silice dans les mines sur lequel s'agrègent les particules de radon qui se déposent alors préférentiellement dans la région centrale du poumon où se développent fréquemment les CBPC.

B/ Les cancers bronchiques non à petites cellules

Les CBNPC ont une origine épithéliale. Ils ont un temps de doublement plus lent que les CBPC, de l'ordre de quelques mois et ils sont peu sensibles aux cytotoxiques, le traitement curatif reposant principalement sur la chirurgie.

a) Le carcinome épidermoïde (Sq)

Le carcinome épidermoïde représente entre 35 et 50 % des cancers pulmonaires, il se développe à partir de l'épithélium des grosses bronches, souvent près d'une bifurcation bronchique. Il se présente sous forme d'une tumeur végétante de taille variable qui peut assez

rapidement obstruer la bronche et être à l'origine d'infections respiratoires. Il peut être peu différencié, différencié immature ou différencié mature, cette dernière forme comprenant une kératinisation importante. Les marqueurs de la différenciation épithéliale peuvent servir d'outils au diagnostic tels que l'involucrine ou les cytokératines. L'antigène SCC (pour *Squamous Cell Carcinoma antigen*) a également été décrit comme un marqueur fort des carcinomes épidermoïdes [73]. Ce carcinome s'étend plus lentement que les autres formes de CBNPC et s'accompagne de métastases tardives. C'est le type de cancer du poumon le plus commun chez les fumeurs. Comme les CBPC, il ne représente que 9 % des cas de cancers pulmonaires associés à l'incorporation de plutonium chez les travailleurs de Mayak [71] et semble plus fortement associé à l'exposition au radon [72]. Une fois encore, la part relative des fumeurs dans les deux cohortes et le dépôt de l'agrégat radon/silice au niveau des bronches où se développent les Sq pourraient partiellement expliquer cette différence.

b) L'adénocarcinome (AC)

L'AC représente 20 à 25 % des cancers pulmonaires, il se développe dans les zones périphériques du poumon [74]. La prolifération tumorale se fait à partir des formations glandulaires muqueuses situées à la périphérie du poumon. Les principaux marqueurs tumoraux sont donc les mucines sécrétées par la tumeur. L'antigène carcino-embryonnaire (CEA) a aussi été observé spécifiquement dans ces tumeurs [75]. Les AC peuvent varier à la fois par leur taille et par leur rapidité de développement. C'est le type de cancer du poumon le plus commun chez les non-fumeurs. Dans un contexte d'exposition au plutonium, il est le cancer le plus répandu, représentant 57 % des cancers professionnels imputables aux radiations ionisantes [71]. Dans les cohortes de mineurs allemands, son incidence ne semble pas associée à l'augmentation de la dose de radon [72].

c) Le carcinome à grandes cellules (CPGC)

Il représente environ 5 % des tumeurs pulmonaires, il se développe à la périphérie des poumons. Il s'agit en général d'une tumeur volumineuse. Son diagnostic est essentiellement un diagnostic d'exclusion qui s'applique aux tumeurs qui n'ont pas l'aspect d'un CBPC et qui ne présentent ni différenciation épidermoïde ni différenciation glandulaire. Il peut présenter plusieurs grades de différenciation neuroendocrine, du moins différencié où il ressemblera à un AC, au plus différencié où il pourra être confondu avec un CBPC [76]. Ce type de tumeur peut évoluer plus rapidement que les AC et les Sq et la maladie est souvent étendue au médiastin, à la plèvre, aux os ou au cerveau au moment du diagnostic. Il est rarement retrouvé

dans les cancers pulmonaires radio-induits que ce soit après exposition au plutonium ou au radon (1 %) [71, 72].

d) Le carcinome adénosquameux (ASq)

Les carcinomes adénosquameux sont rares (inférieurs à 5 %), ce sont des tumeurs dites mixtes formées d'une composante glandulaire comme celle des AC et d'une composante squameuse comme celle des Sq. Des marqueurs glandulaires et squameux peuvent donc y être retrouvés. Le diagnostic est rendu délicat par le déséquilibre possible entre les deux composantes. Pour un diagnostic définitif, les critères anatomopathologiques imposent que le contingent glandulaire et le contingent squameux représentent au minimum 10 % de la tumeur [77]. Au moment du diagnostic, ce type de tumeurs s'accompagne plus fréquemment de nodules métastatiques que les AC et les Sq [78]. Le pronostic est plus mauvais, avec 6,2 % de survie à 5 ans après opération contre 41 % en moyenne pour les AC et les Sq [79]. Comme les CPGC, les ASq sont rarement observés dans les cohortes exposées aux rayonnements ionisants (2 %) [71, 72].

2. Tumeurs pulmonaires chez le rat

Le rat est l'animal d'expérimentation le plus adapté pour l'étude des carcinogènes pulmonaires car il développe peu de tumeurs spontanées du poumon (1 %) [80]. Il est cependant important de signaler quelques particularités d'espèce. La localisation des tumeurs pulmonaires chez le rat est périphérique et l'origine des tumeurs est bronchiolaire et/ou alvéolaire. Les tumeurs d'origine proximale, issues des bronches ou des voies aériennes supérieures, n'existent pas chez les rongeurs. L'extrapolation à l'homme des effets observés chez l'animal est donc fondée sur la comparaison de deux tissus cibles anatomiquement différents. Cependant, l'irradiation peut induire une métaplasie de cellules basales dans les bronchioles périphériques de rat conduisant au développement de tumeurs de type « bronchique » [81]. L'expérimentation chez l'animal permet ainsi de reproduire des tumeurs bronchiques de type épidermoïde et/ou adénosquameux et des adénocarcinomes de morphologie et de comportement biologique (invasion et métastase) comparables à ceux de l'homme [82]. Par contre, les carcinomes à grandes cellules et les carcinomes à petites cellules n'ont jamais été observés chez le rat [83].

Les tumeurs pulmonaires malignes chez le rat ont été décrites dans de nombreux ouvrages et atlas dédiés aux pathologies développées chez le rongeur et le rat de souche Fischer en particulier [81, 84]. Les tumeurs pulmonaires spontanées chez le rat étant rares, les observations sont faites sur des modèles de tumeurs radio- ou chimio-induites.

Les AC sont les plus fréquents chez le rat. Après inhalation de PuO_2 , ils représentent plus de 60 % des tumeurs développées [63]. Après exposition au radon, ces carcinomes semblent se développer indépendamment de la dose et du débit de dose délivrés au poumon. En effet, une augmentation significative de leur incidence a été observée aussi bien après une exposition au radon de 42 WLM (0,2 Gy) à très faible débit de dose (18 WL sur 6 mois) [85] qu'après une exposition à une gamme de doses de 200 à 3200 WLM (1 à 16 Gy) à fort débit de dose (250 à 2000 WL) [61].

Les Sq développés chez le rat peuvent être plus ou moins différenciés et kératinisés, comme chez l'homme. Les Sq radio-induits diffèrent des Sq induits par d'autres carcinogènes de par leur plus grande fréquence et leur développement plus rapide. Ils représentent jusqu'à 20 % des tumeurs radio-induites par le PuO_2 [63]. Après exposition au radon, l'incidence des Sq semble plus importante aux fortes doses et aux forts débits de dose [61, 85], mais rien ne permet, à l'heure actuelle, d'expliquer cette tendance.

Les ASq de rat sont histologiquement proches des ASq humains. Ce sont des tumeurs mixtes associant des composantes cellulaires AC et Sq en proportions variables. Chez le rat, l'ASq est rarement observé après inhalation de particules non radioactives. Par contre, après exposition au PuO_2 , les ASq représentent 13 % des tumeurs pulmonaires développées [63].

Les tumeurs pulmonaires radio-induites chez le rat sont donc histologiquement équivalentes à celles développées chez l'homme avec l'avantage non négligeable d'inclure de nombreux ASq, difficiles à étudier chez l'homme de par leur faible incidence. Ces paramètres font de ce modèle un outil de choix pour approfondir nos connaissances sur la carcinogenèse pulmonaire radio-induite.

III. Evolution histologique et génétique des principaux types de CBNPC

Le concept actuel de la carcinogenèse est fondé sur la notion que le développement d'une tumeur est un long processus évolutif dont les étapes successives sont dirigées par l'accumulation séquentielle d'altérations génétiques dans la descendance d'une seule cellule somatique [86]. Ces événements génétiques impliquent notamment l'activation de proto-oncogènes et/ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur directement liés à la prolifération ou à la mort cellulaire. Ils favorisent ainsi l'invasion du parenchyme par des cellules altérées, formant des lésions pré-néoplasiques puis néoplasiques. Mais cette évolution séquentielle est difficile à reconstituer pour les tumeurs pulmonaires. D'une part, ces tumeurs forment un groupe hétérogène constitué de plusieurs sous-types histologiques qui pourraient dériver d'autant de lésions pré-néoplasiques distinctes. D'autre part, le développement de tumeurs primaires multiples au sein d'un même poumon est fréquent et implique, à une étape plus précoce, la présence possible de nombreuses lésions pré-néoplasiques de grades différents, qui rendent l'analyse complexe. L'OMS a défini trois types de lésions pulmonaires pré-néoplasiques : les lésions bronchiques, les lésions bronchiolo-alvéolaires et les lésions neuroendocrines qui sont candidates pour évoluer vers des Sq, des AC et des CBPC respectivement. Il semble que ces lésions puissent résulter soit de la dispersion d'un clone mutant ancestral, soit d'événements indépendants reflétant la réponse des différents types cellulaires de l'arbre bronchique à un carcinogène. Si l'évolution histologique séquentielle des Sq est largement décrite, celle des AC est moins évidente à définir. L'évolution des carcinomes à différenciation neuroendocrine (CBPC et CPGC) est inconnue étant donné la forte progression tumorale au moment du diagnostic qui rend l'étude des lésions pré-néoplasiques difficile. Une hyperplasie diffuse idiopathique des cellules neuroendocrines pulmonaires est présente chez certains porteurs de CBPC et est proposée comme précurseur potentiel du développement des lésions néoplasiques neuroendocrines [87]. Cependant, il n'a encore jamais été clairement montré génétiquement que cette lésion évoluait vers un désordre néoplasique et métastatique. Aussi, nous ne développerons que les études menées dans les CBNPC non neuroendocrines.

Afin de mieux caractériser l'évolution clonale des lésions pulmonaires, les analyses de mutations de TP53 et de délétions du bras court du chromosome 3 humain sont fréquemment employées. Ces deux altérations sont des événements génétiques précoces de la carcinogenèse pulmonaire (cf. chapitre IV.), marqueurs forts de clonalité [88].

1. Développement des carcinomes épidermoïdes

L'étude du développement des Sq a permis l'identification d'une séquence de développement de lésions prolifératives focales. La progression morphologique de l'épithélium bronchique qui mène dans la plupart des cas à un Sq, commence par une hyperplasie basale qui se caractérise par un épaississement de la couche épithéliale. S'ensuit une dé-différenciation / re-différenciation cellulaire métaplasique menant à la formation d'un épithélium squameux stratifié. La dysplasie épidermoïde est diagnostiquée lorsque les cellules métaplasiques échappent au contrôle de prolifération. Au stade de carcinome in situ, l'épithélium stratifié n'existe plus et les cellules perdent leurs caractéristiques cytologiques. Ce carcinome in situ deviendra un carcinome épidermoïde malin par l'acquisition d'un pouvoir invasif (pour revue, Chyczewski et coll. 2001) [87].

L'analyse moléculaire des altérations du gène TP53 et de la région chromosomique 3p permet de valider ce scénario de progression tumorale. Kohno et coll. ont en effet proposé de comparer, pour 61 patients, les altérations génétiques des lésions pré-néoplasiques et néoplasiques présentes chez chaque patient [89]. Leurs résultats montrent un profil de LOH en 3p systématiquement commun aux deux types de lésions et, pour deux patients, une mutation de TP53 identique dans les lésions appariées.

2. Développement des adénocarcinomes

Le développement séquentiel des AC est moins connu. L'hyperplasie adénomateuse atypique (AAH) a été décrite comme précurseur potentiel de ces carcinomes. C'est une lésion de petite taille (1 à 3 mm) qui se développe préférentiellement dans le poumon périphérique, composée de cellules atypiques assez proches des cellules de Clara et pneumocytes II du parenchyme bronchiolaire et alvéolaire. Cependant, les étapes de progression des AAH vers l'adénocarcinome ne sont pas connues et aucun grade précoce, intermédiaire ou avancé de différenciation des AAH n'est défini par l'OMS. Ce type de lésion pré-invasive est moins fréquent que les dysplasies épidermoïdes et se retrouve dans 12 à 23 % des patients atteints d'un cancer pulmonaire primaire, avec une prédominance chez les patients opérés pour un AC (40 %) par rapport aux patients atteints d'un Sq (9 %) [90].

L'étude de mutation du gène TP53 ne permet pas de préciser si l'évolution de ces lésions mène aux AC. En effet, les quelques données génétiques effectuées sur des AAH indiquent que la mutation du gène TP53 est rare (inférieur à 3 %) et apparaît préférentiellement à un

stade avancé de la progression de ces lésions [91]. Kohno et coll. montrent que seuls 15 % des AAH analysés présentent une mutation de TP53 ou une perte du chromosome 3p et confirment que ces altérations génétiques n'apparaissent que tardivement dans la progression de ces lésions [89]. Les mutations de TP53 et la perte du chromosome 3p ne sont donc pas des marqueurs forts de clonalité dans les AAH et ne permettent pas de définir une quelconque évolution vers les AC. Récemment, une dysplasie des cellules bronchiolaires cylindriques a été décrite qui se caractérise par une désorganisation de l'épithélium bronchiolaire et qui présente une perte du 3p commune aux AC [92]. Cependant, aucune étude génétique plus précise n'a encore été entreprise à l'heure actuelle.

3. Cas particulier des carcinomes adénosquameux

Du fait de la faible incidence des ASq chez l'homme, peu d'études génétiques sur ces tumeurs ont été menées et leur histogenèse est mal connue. D'un point de vue histologique, le développement de ces tumeurs mixtes, contenant deux composantes AC et Sq, peut s'expliquer de plusieurs manières. Il peut s'agir d'un AC au milieu duquel se serait développée une métaplasie squameuse, ou d'une collision de deux tumeurs AC et Sq distinctes [93, 94]. Dans ces deux cas, la tumeur mixte serait due au développement de deux clones cellulaires distincts. Une autre hypothèse est le développement monoclonal d'une cellule indifférenciée bipotente susceptible, sous l'influence de l'environnement tumoral, de changer de profil de différenciation [95].

Bien que les ASq soient morphologiquement bien définis, très peu d'approches génétiques sur leur clonalité ont été entreprises. La première étude de clonalité a été menée en 1981 par l'équipe de Steele [96]. Sur 10 cellules isolées d'un ASq murin (au phénotype AC ou Sq), 8 clones ont produit des ASq. Ce sont de nouveaux des ASq qui se sont développés après inoculation *in vivo*. Ces résultats ont permis de supposer que les ASq ne sont pas le résultat d'un mélange de cellules programmées pour chacun des deux phénotypes, mais bien le résultat d'une différenciation d'un unique type cellulaire. Une analyse plus récente révèle des mutations de TP53 communes entre les deux composantes d'ASq humains, renforçant l'hypothèse de l'expansion monoclonale de ce type de tumeurs [97].

Ces quelques études sur la nature clonale des tumeurs mixtes ASq appuient fortement l'hypothèse d'un développement monoclonal. Le modèle de carcinogenèse pulmonaire chez le rat, qui fournit des ASq radio-induits en fréquence élevée, est une aubaine pour l'étude plus approfondie de ces tumeurs.

IV. Les gènes majeurs de la carcinogenèse pulmonaire

1. Le gène TP53

A/ Dérégulation de TP53 dans les tumeurs pulmonaires humaines

Selon la base de données proposée et actualisée par Knuutila et coll. regroupant les résultats d'hybridation génomique comparative (CGH pour *Comparative Genomic Hybridization*) pour 73 types de tumeurs (www.helsinki.fi/cmg), des délétions du chromosome 17p sont observées dans 75 % des CBPC et 46 % des CBNPC humains [98]. Une perte d'hétérozygotie du locus de TP53 est détectée dans 52 % des CBNPC [99]. Dans la majorité des cancers pulmonaires, la perte d'un allèle normal de TP53 démasque un allèle altéré par une mutation ponctuelle.

Selon la base de données R11 de l'IARC, qui regroupe plus de 21 500 mutations somatiques de TP53 identifiées dans les cancers (tous types confondus), les mutations du gène sont à 88 % des substitutions de base [100-102]. La plupart des mutations se produisent au niveau de la séquence codant la partie centrale de la protéine, responsable de la liaison à l'ADN. Au niveau de cette séquence, certains résidus sont plus fréquemment mutés que les autres et sont considérés comme des points chauds ou « hot spots » de mutation. Dans les cancers du poumon, les principaux points chauds se situent au niveau des codons 157-158, 245-248-249 et 273 et représentent 27 % des mutations somatiques observées [102]. De plus, dans ces cancers, 31 % des mutations ponctuelles sont des transversions G-T du brin codant, contrairement aux autres cancers dans lesquels prédominent les transitions G-A (42 %) [101]. Une relation entre les habitudes tabagiques et la fréquence des transversions G-T dans les cancers du poumon a été établie par de nombreuses équipes [103-105]. Trente pour cent des tumeurs développées chez les fumeurs présentent une transversion G-T pour seulement 12 à 15 % des tumeurs diagnostiquées chez les non-fumeurs. En revanche, les transitions G-A sont plus fréquentes chez les personnes n'ayant jamais fumé [105, 106]. Il est intéressant de noter que les transitions G-A sont aussi les principaux types de mutations ponctuelles du gène TP53 observés dans les tumeurs pulmonaires des survivants non-fumeurs d'Hiroshima et de Nagasaki [107].

Toutes les études de mutation du gène TP53 dans les tumeurs pulmonaires induites après inhalation d'émetteurs α chez l'homme ont été menées dans un contexte d'exposition au radon. Les recherches de mutations spécifiques du gène TP53 dans les cancers pulmonaires de mineurs d'uranium ont fourni des résultats discordants. Une première étude menée en 1994 a

montré la présence d'une transversion G-T au codon 249 dans 31 % des 52 tumeurs pulmonaires étudiées, comprenant des Sq (79 %) et des CPGC (21 %). Ces tumeurs provenaient de travailleurs miniers américains fumeurs ou non-fumeurs fortement exposés au radon (dose cumulée supérieure à 1000 WLM, soit 5 Gy) [108]. Cette mutation récurrente n'ayant pas été retrouvée dans une série de 23 AC provenant de la même cohorte de mineurs [109], les auteurs ont conclu qu'à fortes doses de radon, cette altération génétique pouvait être un marqueur moléculaire spécifique des Sq et des CPGC induits. Plusieurs autres études ont été menées dans le but de rechercher cette mutation particulière dans les cancers du poumon radon-induits d'une cohorte de mineurs allemands exposée à une dose cumulée moyenne de 1011 WLM et comprenant de nombreux Sq [110-113]. Cependant, la prévalence et la spécificité de la mutation au codon 249 de TP53 n'a été confirmée par aucune de ces études (pour revue, Vähäkangas et coll. 2003) [103]. Dans le cadre d'une étude cas-témoin sur l'exposition domestique au radon, une recherche de cette mutation a été entreprise sur une série de tumeurs pulmonaires associées à des expositions allant de 0,5 à 30 WLM (2,5 mGy à 0,1 Gy). Toutefois, parmi les 17 cas analysés issus de fumeurs et de non-fumeurs, aucune mutation au codon 249 n'a été rapportée [114]. L'absence de profil spécifique de mutations du gène TP53 dans les cancers du poumon associés au radon domestique a également été conclue suite à l'étude d'une cohorte suédoise exposée à plus de 140 Bq/m³ (environ 0,6 WLM ou 3 mGy) [115].

B/ Dérégulation de Tp53 dans les cancers pulmonaires chez le rat

Dans les tumeurs pulmonaires de rat, les mutations du gène Tp53 sont plus rares que chez l'homme. Sur 103 tumeurs induites chimiquement, seulement 2 mutations ponctuelles ont été détectées [116].

Toutes les études relatives aux tumeurs pulmonaires induites chez le rat par inhalation de radon ont eu pour objectif, en premier lieu, de démontrer l'effet carcinogène de ce facteur environnemental, puis d'analyser l'influence des différents paramètres de l'exposition sur l'incidence des tumeurs. En revanche, la littérature scientifique ne rapporte qu'une seule analyse génétique basée sur la recherche de mutations somatiques de Tp53. Cette étude porte sur 15 tumeurs induites par une gamme de dose de radon de 500 à 1000 WLM (2,5 à 5 Gy) pour lesquelles aucune mutation du gène n'est détectée [117]. Après inhalation de dioxyde de plutonium, deux études rapportent une mutation du gène dans 5 % et 13,5 % des tumeurs respectivement. Dans la première étude, ce sont deux tumeurs qui portent une transition G-A [118]. Dans la seconde, 8 mutations sur 11, localisées dans les exons 5 et 6 du gène Tp53,

sont également des transitions G-A [119]. Ces données confirment la faible fréquence de mutation de Tp53 dans les tumeurs pulmonaires de rat, y compris les tumeurs radio-induites par des rayonnements α .

C/ Dérégulation de la protéine p53 par MDM2

Le gène MDM2 humain comprend 12 exons et est localisé sur le bras long du chromosome 12 humain, en 12q14.3-q15. Chez le rat, il se trouve en 7q22 et comporte 15 exons. La protéine Mdm2 a une fonction E3-ubiquitine-ligase, c'est-à-dire qu'elle lie de façon covalente un ou plusieurs résidus ubiquitine à son substrat, en l'occurrence la protéine p53. Cette liaison entraîne la délocalisation de p53 dans le cytoplasme et sa dégradation par le protéasome 26S [120]. Le gène MDM2 est donc un régulateur négatif de la voie de TP53 et son activité oncogénique explique qu'il soit amplifié et sur-exprimé dans de nombreux cancers [121]. Cependant, dans la grande majorité des tumeurs, les mutations de TP53 et les amplifications de MDM2 sont exclusives [121]. Dans les tumeurs pulmonaires humaines, ce sont plutôt les mutations de TP53 qui dominent, les amplifications de MDM2 n'étant observées que dans 6 à 7 % des CBNPC [122, 123]. Chez le rat, où la mutation de Tp53 n'est pas fréquente, peu d'études d'amplification de Mdm2 ont été menées. Seule une étude a été proposée sur des tumeurs induites par rayons X, pour lesquelles aucune amplification du gène n'a été rapportée [124].

2. Le locus CDKN2a

A/ Dérégulation de p16INK4a dans les cancers pulmonaires humains

Chez l'homme, l'analyse de tumeurs pulmonaires par CGH met en évidence que 64 à 83 % des CBNPC ont une perte en 9p21 [98, 125], pour seulement 19 % des CBPC [126]. Localisé dans cette région, p16INK4a est désigné comme le gène suppresseur de tumeur impliqué dans la carcinogenèse pulmonaire. Les recherches de LOH près du gène p16INK4a renforcent cette hypothèse car plus de 50 % des CBNPC présentent une perte allélique [127, 128]. Le rôle majeur de p16INK4a dans la carcinogenèse pulmonaire se confirme par les analyses directes du gène qui révèlent son altération génétique dans 70 % de ces tumeurs [129].

Ce gène suppresseur de tumeur peut être inactivé par divers mécanismes génétiques et épigénétiques tels que la délétion homozygote, la mutation ou la méthylation. Gazzeri et coll. ont été les premiers à définir la fréquence relative de chacun de ces mécanismes dans les

tumeurs pulmonaires humaines : sur 21 CBNPC n'exprimant pas la protéine p16^{INK4a} (49 % des cas), ils ont montré que 10 tumeurs présentaient des délétions homozygotes (48 %), que 3 d'entre elles portaient des mutations ponctuelles (14 %) et que 7 autres étaient hyperméthylées au niveau des îlots CpG de l'exon 1α du gène (33 %) [130]. Par la suite, la perte d'expression de la protéine p16^{INK4a} a été confirmée dans 40 à 50 % des CBNPC [131-133]. En revanche, les délétions homozygotes du gène p16INK4a n'ont été observées que dans 34 % des CBNPC [134]. Les mutations ponctuelles sont également moins fréquentes, elles sont détectées dans 5 à 8 % des CBNPC [135, 136]. Concernant l'analyse du taux de méthylation de p16INK4a, Merlo et coll. ont suggéré que l'hyperméthylation du promoteur de p16INK4a corrélait mieux à la perte d'expression du gène que la méthylation de l'exon 1α [137]. Par l'étude du promoteur, plusieurs équipes confirment les données de méthylation obtenues pour l'exon 1α : 22 à 30 % des CBNPC présentent une hyperméthylation de p16INK4a [138, 139]. Une autre étude, également basée sur la méthylation du promoteur de p16Ink4a, rapporte, elle, une fréquence de méthylation de 50 % dans les CBNPC [140]. Des variations de méthylation au sein des divers CpG du promoteur de p16Ink4a ayant été décrites [141], les différences observées d'une étude à l'autre peuvent être dues aux différents sites CpG qui ont été analysés lors de la PCR spécifique de la méthylation (MSP pour *Methylation Specific PCR*).

L'inactivation du gène p16INK4a est rare dans les CBPC où l'inactivation du gène RB1 domine à 90 % (cf. chapitre IV.3.B) [142]. Aucune délétion homozygote du gène n'a été détectée dans les lignées cellulaires de CBPC [143]. La fréquence de méthylation de p16INK4a est également plus faible dans les CBPC que dans les CBNPC avec seulement 6 % de cas d'hyperméthylation du promoteur [139].

A ce jour, aucune étude sur les mécanismes d'inactivation de p16INK4a n'a été menée sur des tumeurs pulmonaires humaines radon-induites. Concernant les tumeurs pulmonaires radio-induites, seule une étude de méthylation a été proposée sur 70 AC de travailleurs de Mayak exposés au plutonium. Elle décrit une augmentation de la méthylation de p16INK4a dans la cohorte de travailleurs par rapport à une population témoin (respectivement 62 % et 43 % des tumeurs méthylées) [144].

B/ Dérégulation de p16Ink4a dans les cancers pulmonaires chez le rat

L'étude de l'inactivation de p16Ink4a dans les tumeurs pulmonaires induites chez le rongeur est rare. Une seule analyse par CGH de tumeurs pulmonaires radon-induites de rat

montre une perte récurrente de la région 5q11-33 dans 6 AC sur 12 (50 %) [145]. En terme de LOH, seules des données chez la souris sont disponibles où, en moyenne, 40 % des AC analysés présentent une perte allélique près du locus de *Cdkn2a* [146, 147]. Les mutations de *p16Ink4a* n'ont jamais été recherchées dans les tumeurs pulmonaires de rat. Chez la souris, aucune mutation du gène n'a été mise en évidence, que ce soit dans des tumeurs pulmonaires induites par de l'aflatoxine B1 [148] ou du chlorure de méthylène [149], rejoignant le faible taux de mutation observé chez l'homme. En terme de délétion, si 40 % de délétions homozygotes sont détectées dans les lignées cellulaires pulmonaires de rat, aucune délétion n'a été retrouvée dans les tumeurs primaires correspondantes, qu'elles soient induites par des rayons X ou de l'oxyde de plutonium [150]. En revanche, dans ces mêmes tumeurs, l'hyperméthylation de l'exon 1 α de *p16Ink4a* est observée dans 72 % des cas. Ce taux élevé de méthylation est retrouvé dans les carcinomes induits par exposition au diesel, au carbone et au béryllium (59, 45 et 80 %, respectivement) [151].

Ces quelques études de *p16Ink4a* chez le rat fournissent des données quant aux mécanismes d'inactivation du gène dans la carcinogenèse pulmonaire expérimentale. Comme chez l'homme, la perte récurrente de matériel génétique au niveau du locus fait de *p16Ink4a* un gène candidat fort. Le faible taux de mutation et le fort taux de méthylation décrits dans les CBNPC humains se retrouvent dans le modèle animal. Seules les délétions homozygotes semblent moins fréquentes dans les tumeurs primaires de rat.

Il est intéressant de noter que chez le rat, comme chez l'homme, aucun des mécanismes d'inactivation de *p16Ink4a* ne semble intervenir spécifiquement pour un carcinogène donné.

C/ Dérégulation du transcrit alternatif p14ARF/p19Arf

Les pertes de matériel génétique altérant le gène *p16INK4a* sont généralement larges et entraînent souvent la co-délétion de l'exon 1 β de *p14ARF/p19Arf*. En effet, les délétions homozygotes affectant les deux gènes sont couramment décrites chez l'homme. Elles concernent 30 % des CBNPC [135] et 38 % des lignées cellulaires de CBNPC [152]. Mais *p14ARF* est moins fréquemment étudié que *p16INK4a*. De rares mutations de *p14ARF* ont été localisées dans l'exon 2, commun aux deux gènes [135, 152]. Aucune mutation dans l'exon 1 β spécifique de *p14ARF/p19Arf* n'est répertoriée à ce jour, ni chez l'homme, ni chez le rongeur [153-155]. En terme de méthylation, contrairement à *p16INK4a*, le taux de méthylation de *p14ARF* est faible (inférieur à 34 %), voire nul dans la majorité des lignées cellulaires et tumeurs pulmonaires humaines analysées, que ce soit au niveau du promoteur ou

de l'exon 1 β [152, 154, 156]. Dans les carcinomes pulmonaires de souris induits par de l'aflatoxine B1, il apparaît que seulement 6 % des îlots CpG du promoteur de p19Arf sont méthylés contre 63 % des CpG du promoteur de p16Ink4a [148]. Ces résultats indiquent que, chez l'homme et le rongeur, p16INK4a est la cible préférentielle des altérations du locus CDKN2a.

Parce que p14ARF/p19Arf appartient à la voie de régulation de TP53, certains auteurs supposent que l'inactivation concomitante des deux gènes est rare dans une même tumeur. La forte incidence de mutations de TP53 décrite dans les CBNPC humains pourrait ainsi expliquer le faible taux d'inactivation de p14ARF. Cependant, à l'heure actuelle, aucune étude simultanée des deux gènes ne met en évidence de corrélation inverse entre la mutation de TP53 et la mutation ou la délétion homozygote de p14ARF, la fréquence des altérations de ce dernier gène étant équivalente dans les CBNPC porteurs ou non de mutations de TP53 [135, 152, 153].

Bien que p14ARF/p19Arf soit décrit comme gène suppresseur de tumeur, de par son rôle dans la voie de régulation de TP53, il reste encore peu étudié dans les tumeurs pulmonaires et semble être une cible secondaire des pertes observées en 9p21 chez l'homme et en 5q32 chez le rat.

3. Autres gènes de la carcinogenèse pulmonaire

A/ Le gène p15INK4b

Le gène p15INK4b code pour une protéine de la classe des inhibiteurs du cycle cellulaire INK4 à laquelle appartient p16^{INK4a}. Cette protéine forme un complexe avec les kinases CDK4 et CDK6 et fonctionne comme un régulateur de croissance cellulaire en contrôlant la progression du cycle en phase G1 par le même processus que p16^{INK4a}. Chez l'homme, le gène p15INK4b est positionné à 10 kb de p14ARF. Par conséquent, il est fréquemment co-déléte avec le locus CDKN2a [143, 157]. Cependant, aucune mutation du gène n'a jamais été observée [143, 157, 158] et la méthylation du promoteur, de 4 à 11 %, est très faible par rapport à celle de p16INK4a [159, 160].

Le rôle précis de p15INK4b dans la carcinogenèse reste inconnu. Récemment, chez des souris invalidées pour p16Ink4a, une augmentation de la fréquence de tumeurs a été mise en évidence en absence de p15Ink4b, suggérant un effet de soutien de p15Ink4b dans la régulation de la prolifération cellulaire en absence de p16Ink4a [161].

B/ Le gène RB1

La mutation de RB1 est retrouvée dans un nombre restreint de cancers, tels que les rétinoblastomes, les ostéosarcomes et les CBPC. Cependant, la déficience de la « voie RB », que ce soit par inactivation de p16INK4a ou sur-expression de la cycline D1 ou de Cdk4, sont observées dans la plupart des tumeurs [162].

Les analyses de tumeurs pulmonaires par la méthode de CGH mettent en évidence des différences significatives entre les tumeurs neuroendocrines et non-neuroendocrines : la perte de matériel génétique de la région chromosomique 13q12-14 est détectée dans 75 % des CBPC, alors que cette région n'est perdue que dans 36 % des CBNPC [98]. Les études de LOH au locus de RB1 révèlent des pertes alléliques dans 93 % des CBPC [163] pour 47 à 62 % des CBNPC [128, 163]. Ces résultats corrélerent avec une absence d'expression du transcrit RB1 dans 60 à 77 % des lignées cellulaires de CBPC [164, 165] et dans 64 % des CBPC primaires [166]. Des anomalies de l'expression de la protéine pRb ont également été détectées par immunohistochimie dans 78 à 100 % des CBPC [166-168]. Au niveau de la séquence du gène RB1, aucune méthylation n'a été observée dans les CBPC [166]. Des délétions homozygotes ont été détectées dans 8 % des cas [165]. Trois délétions de 1 à 2 paires de bases ont été décrites dans des lignées cellulaires de CBPC, localisées aux exons 20, 22 et 23 du gène [169]. Une mutation par substitution a été rapportée dans une autre lignée qui mène à la production d'une protéine hypophosphorylée non fonctionnelle [170]. Mais le faible taux d'altérations du gène ne corréle pas au taux élevé de LOH et ne peut pas, à lui seul, justifier de la perte d'expression fréquemment décrite dans ces tumeurs.

Dans les CBNPC, de rares mutations ponctuelles ont été décrites [171-173]. Une perte ou une réduction de l'expression de la protéine a été mise en évidence par immunohistochimie dans 17 à 56 % des cas [131, 132, 174], avec une fréquence plus élevée dans les AC que dans les Sq (33 % et 14 % respectivement) [175].

L'étude de Rb1 dans les CBPC de rongeur est quasiment inexistante du fait de la faible incidence de ce type de tumeurs. Néanmoins, un nouveau modèle de souris vient d'être proposé qui doit permettre l'induction de tumeurs pulmonaires similaires aux CBPC humains [176] et qui devrait faire avancer nos connaissances sur ces tumeurs particulièrement agressives. Dans les CBNPC, une perte de matériel génétique dans la région chromosomique 5q de rat a été observée dans 42 % des AC [145]. Malgré le peu de données existantes dans ces tumeurs, une analyse comparative de AC chez l'homme et la souris a permis d'entrevoir un mécanisme et une fréquence de dérégulation de RB1 équivalents dans les deux espèces [177].

C/ Les gènes RAS

Les trois membres de la famille des gènes RAS, H-RAS (homologue cellulaire de l'oncogène viral responsable du sarcome murin de Harvey), K-RAS (homologue de l'oncogène viral du sarcome murin de Kirsten) et N-RAS (identifié à partir d'une lignée cellulaire de neuroblastome), sont localisés respectivement en 11p15.5, 12p12.1 et 6p13 chez l'homme (1q41, 4q44 et 2q34 chez le rat). Les produits de ces gènes sont des polypeptides localisés dans le cytosol, ancrés dans la membrane plasmique. Ces protéines sont inactives lorsqu'elles sont couplées au GDP (pour *Guanosine DiPhosphate*), deviennent actives lorsqu'elles se fixent au GTP (pour *Guanosine TriPhosphate*) et acquièrent la capacité d'hydrolyser le GTP pour un contrôle rétroactif. La voie de signalisation des RAS est initiée par la fixation de facteurs de croissance extra-cellulaires à leurs récepteurs membranaires (dont EGFR pour *Epidermal Growth Factor Receptor*). Cette fixation entraîne la dimérisation des récepteurs qui provoque une cascade d'activation conduisant à l'échange d'un GDP par un GTP sur les protéines RAS. Une fois actives, ces protéines activent à leur tour de nombreux facteurs de transduction du signal, dont RAF et les protéines de la cascade des MAPK (pour *Mitogen-Activated Protein Kinases*). Ces voies de transduction mènent finalement à l'expression de gènes tels que MYC, FOS et JUN, et favorisent l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire. Les mutations affectant la structure des protéines RAS entraînent la stabilisation de la protéine sous sa forme active et la perte de l'activité GTPase. La fixation à un GTP et la transduction du signal, en devenant constitutives, conduisent à la perte du contrôle du cycle cellulaire, conférant ainsi aux protéines RAS mutées un potentiel oncogénique.

La conversion des proto-oncogènes de la famille RAS, fréquente dans de nombreux types de cancers, survient préférentiellement par mutation ponctuelle. Le mutant N-RAS est retrouvé dans les mélanomes et les leucémies. Les mutations de H-RAS sont plus souvent associées aux tumeurs du tractus urinaire. Ce sont les mutations de K-RAS qui sont les plus répandues, notamment dans les cancers du colon, du pancréas et du poumon [178]. Les mutations activatrices du gène K-RAS surviennent sur les codons 12, 13 et 61 des exons 1 et 2 (régions conservées entre l'homme et le rat). Toutefois, dans le cas des tumeurs pulmonaires, la majorité des mutations affectent le codon 12 [106, 116]. Chez l'homme, ce sont les transversions G-T qui dominent, décrites comme spécifiques du tabac [105, 179, 180]. L'incidence de mutations de K-RAS varie en fonction des types histologiques : aucune mutation n'a été détectée dans les CBPC humains alors que le taux de mutation varie de 11 à

36 % dans les tumeurs primaires et les lignées cellulaires de CBNPC [106, 129, 181], avec une fréquence plus élevée dans les AC (21 %) que dans les Sq (9 %) [105].

Les analyses moléculaires du proto-oncogène K-RAS dans les tumeurs pulmonaires de mineurs d'uranium ont montré une mutation dans 39 % des cas, mais aucune spécificité ne permet de refléter leur étiologie [109]. Chez le rat, la recherche de mutation de K-Ras dans les tumeurs pulmonaires radon-induites n'a pas été proposée. En revanche, dans les tumeurs pulmonaires induites par le plutonium, des altérations de K-ras sont identifiées dans 46 % des cas avec une majorité de substitutions par transition G-A en première position du codon 12 [116].

D/ Les gènes MYC

La famille des gènes MYC comprend 5 membres, C-, N-, L-, S- et B-MYC. Ces gènes codent pour des phosphoprotéines nucléaires régulant notamment la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose. Les protéines de cette famille ont chacune des fonctions spécifiques et leurs profils d'expression varient selon les tissus. Les facteurs de transcription MYC sont activés par la formation possible d'hétérodimères avec la protéine MAX (pour *MYC associated factor X*). Bien que les mécanismes d'action des protéines MYC ne soient pas encore entièrement connus, la protéine C-MYC, la mieux caractérisée de cette famille, a été décrite comme directement impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire. En effet, l'expression de C-MYC favorise l'activation du complexe Cycline E/Cdk2 et active la transcription de la cycline D et de Cdk4. Il a également été montré qu'une surexpression de MYC induisait une surexpression de E2F dans les CBPC [182].

Contrairement à RAS qui est fréquemment activé par mutation, MYC est surexprimé suite à une amplification génomique. L-MYC et N-MYC, localisés en 1p34.3 et 2p24.3 chez l'homme (5q36 et 6q14 chez le rat), n'ont été rapportés amplifiés que dans les CBPC [182-185]. L-MYC a une fréquence d'amplification plus élevée dans les tumeurs obtenues par xénogreffe (43 %) que dans les tumeurs neuroendocrines primaires (13 à 17 %) avec un nombre de copies pouvant être 35 fois supérieur au tissu normal. N-MYC a une fréquence d'amplification plus faible que L-MYC (8 % en moyenne), mais cette amplification peut être jusqu'à 80 fois supérieure à celle du tissu normal. Le gène C-MYC humain est, lui, localisé en 8q24. Cette région chromosomique est affectée par des amplifications génomiques dans 10 % des CBPC et des CBNPC analysés par CGH [98]. Au niveau du gène, une incidence de 5 à 10 % d'amplification de MYC dans les CBNPC est confirmée par plusieurs études [186-188].

Détectée principalement dans les stages cliniques avancés, cette amplification de MYC ne semble pas représenter un évènement initial dans la transformation maligne, mais surviendrait plus tardivement lors de la progression tumorale [188, 189].

4. Autres régions chromosomiques fréquemment altérées et gènes candidats

Des études cytogénétiques et moléculaires ont rapporté des déséquilibres récurrents de nombreuses autres régions chromosomiques autant dans les CBPC que dans les CBNPC [190, 191]. La base de données de Knuutila et coll. fournit une bonne revue de la littérature [98]. Les régions 3p, 4q, 5q et 13q sont des régions délétées dans plus de 60 % des tumeurs pulmonaires (CBPC et CBNPC confondus), tandis que 10q est une région délétée majoritairement dans les CBPC. Les gains des régions 3q, 5p et 8q, quant à eux, sont les plus récurrents dans les CBPC et les CBNPC avec des fréquences beaucoup plus faibles que les pertes, affectant moins de 20 % des tumeurs.

A/ Délétion du 3p

Le bras court du chromosome 3 humain est délété dans 90 à 100 % des CBPC et dans 60 à 73 % des CBNPC [98]. Les études par LOH ont permis de définir plusieurs régions distinctes, cibles de délétions fréquentes : 3p25, 3p12-14 et 3p21 [192]. Pour chaque région, plusieurs gènes candidats ont été proposés (pour revue, Zabarovsky et coll. 2002) [193]. Nous n'exposerons ici que les principaux candidats.

En 3p25 se trouve localisé le gène suppresseur de tumeur VHL (pour *Von Hippel-Lindau*). L'inactivation de ce gène est associée à un accroissement de l'angiogenèse, due à la perte de contrôle négatif sur les gènes induits par hypoxie, notamment VEGF [194]. Une perte allélique du gène est détectée dans 83 % des CBNPC, mais aucune mutation n'a été observée [195].

Le gène FHIT (pour *Fragile Histidine Triad*) est proposé comme la cible des délétions en 3p14. Dans les CBNPC, une perte allélique est fréquemment observée à ce locus (58 %) [128] et la méthylation du gène est détectée dans 37 % des tumeurs primaires et 65 % des lignées cellulaires [196, 197]. La perte de la protéine FHIT est corrélée à une forte prolifération et une diminution de l'apoptose dans les CBNPC et particulièrement dans les Sq [198]. Ce n'est que récemment que son action pro-apoptotique a été définie dans des lignées cellulaires dérivées de CBNPC via l'activation de la voie des récepteurs de mort [199].

Sur la bande 3p12, le gène ROBO1 (*Roundabout, axon guidance receptor, homolog 1*) a été proposé comme candidat [200]. Ce gène, codant pour une protéine de la famille des molécules d'adhésion neurales (N-CAM, *neural cell adhesion molecule 1*), est muté dans 33 % des AC de rat étudiés par Tsujiuchi et coll. [201]. Dans les CBNPC humains, aucune mutation et seulement 4 % de méthylation du gène ont été détectés [202]. De plus, le rôle précis de la protéine dans la carcinogenèse est mal connu. Des études supplémentaires sont donc requises pour déterminer si ROBO1 a une fonction de gène suppresseur de tumeur dans la carcinogenèse pulmonaire.

Enfin, en 3p21, RASSF1 (*Ras association domain family member 1*) a été proposé comme gène suppresseur de tumeur. Ce gène, localisé en 3p21.3, présente une méthylation de son promoteur dans 40 % des CBNPC [203, 204]. C'est un gène qui semble inhiber l'accumulation de la cycline D1 au cours du cycle cellulaire, possiblement via son effet anti-oncogénique sur JNK [205]. Un autre gène localisé en 3p21.3 appelé SEMA3B ou semaphorin 3B a été ciblé. Ce gène de la famille des sémaphorines/collapsines joue un rôle majeur dans l'orientation des axones et a été proposé comme suppresseur de tumeur pour sa capacité à activer l'apoptose via p53 [206]. La double altération du gène par LOH et méthylation est retrouvée dans 45 % et 50 % des tumeurs et lignées cellulaires de CBNPC [207, 208].

Cependant, dans l'état actuel de nos connaissances, aucun de ces gènes candidats localisés sur le 3p ne peut expliquer le taux élevé de délétions de cette région dans les cancers pulmonaires.

B/ Délétion du 4q

La région 4q22-ter est délétée dans 68 % des CBPC et la région 4q31-ter dans 60 à 64 % des CBNPC [98]. Par la technique de LOH, trois zones de délétion plus restreintes ont été définies, elles concernent le 4q33, le 4q34.1 et le 4q34.3-35.2 [209]. Le gène CARF, localisé en 4q35, a récemment été proposé comme gène suppresseur de tumeur candidat dans des adénocarcinomes de l'œsophage [210]. La protéine codée par ce gène interagit avec p14^{ARF} et active les fonctions de p53 [211]. Il semble que cette protéine puisse aussi interagir avec Mdm2 et soit dégradée par la voie du protéasome Mdm2-dépendante. La fonction de ce gène fait de lui un candidat fort des délétions récurrentes en 4q35, mais sa récente découverte ne permet pas de définir, pour le moment, son rôle dans la carcinogenèse pulmonaire.

Le gène Fbw7 (*F-box and WD repeat domain containing 7*), localisé en 4q31.3, est un gène suppresseur de tumeur qui code pour une protéine « F-box » responsable de l'ubiquitination de nombreuses oncoprotéines telles que la cycline E, c-MYC, c-JUN ou NOTCH. Il est muté

dans divers cancers humains, dont les cancers pulmonaires, avec une fréquence de mutation de 6 % en moyenne [212, 213]. Il semble cependant que la mutation du gène soit rare dans les adénocarcinomes [214]. Des études plus approfondies de ce candidat potentiel sont encore nécessaires avant de statuer sur le rôle qu'il pourrait jouer dans la carcinogenèse pulmonaire.

C/ Délétion du 5q

Dans les CBPC, la région 5q21-ter est délétée dans 76 % des cas. Dans les CBNPC, la région 5q14-23 est délétée dans 55 % des cas [98]. En 5q21, région communément perdue dans les deux types de tumeurs, se trouvent les gènes MCC et APC qui subissent une perte d'hétérozygotie dans 41 % des CBNPC [215]. Le gène APC (pour *Adenomatosis Polyposis Coli*) code pour une protéine qui, en se fixant à la β -caténine, régule négativement la voie de prolifération cellulaire par Wnt. APC est un suppresseur de tumeur muté dans la majorité des cancers du colon. En revanche, dans les cancers pulmonaires, les mutations du gène sont rares (0 à 5 %) [215, 216]. Les fréquentes pertes alléliques sont plutôt associées à une méthylation aberrante du promoteur dans 71 % des CBNPC et 38 % des CBPC [217]. Le gène MCC (pour *Mutated in Colorectal Cancers*), quant à lui, est fréquemment co-délété avec APC dans les tumeurs pulmonaires [218] mais son rôle dans la régulation négative du cycle cellulaire est encore mal connu.

D/ Délétion du 13q

D'après les données de CGH, trois régions du 13q sont majoritairement délétées : la région 13q14 dans les CBPC qui contient le gène RB1 (détaillé au chapitre IV.3.B), la région 13q21 perdue dans 65 % des CBPC et des CBNPC, et la région 13q33-34 perdue préférentiellement dans les CBNPC (58 %) [98].

Pour la région 13q21, après des analyses dans des tumeurs du sein et de la prostate, l'équipe de Chen propose comme candidat le gène KLF5 (*Kruppel-like factor 5*) récemment décrit comme facteur de transcription [219, 220]. Ils décrivent une perte allélique et une perte d'expression fréquente du gène, mais aucune mutation, méthylation ou délétion homozygote. L'inhibition de croissance des lignées cellulaires de sein et de prostate, après réintroduction du gène sauvage, suggère un rôle suppresseur de tumeur. Cependant, aucune analyse de KLF5 n'a encore été effectuée dans les tumeurs pulmonaires. Par ailleurs, en 13q21.2, se trouve localisé un autre candidat PCDH20 (protocadhérine 20), qui est inactivé dans 54 % des lignées de CBNPC par hyperméthylation. La restauration de l'expression du gène ralentit la prolifération cellulaire, faisant de ce gène un facteur potentiel de la carcinogenèse pulmonaire

[221]. En 13q34 se trouve un candidat suppresseur de tumeur appelé ING1 (pour *Inhibitor of Growth family, member 1*). La protéine produite par ce gène est capable de se fixer à p53 au site de fixation de Mdm2 et peut ainsi protéger p53 de la dégradation [222]. Une diminution d'expression du gène a été détectée dans 42 % de CBNPC, principalement dans les cas ne présentant pas de mutation de TP53 [223]. ING1 semble donc être un candidat fort de la carcinogenèse pulmonaire et son rôle précis dans ce processus mérite d'être approfondi.

E/ Délétion du 10q

La délétion du 10q23-ter humain est détectée par CGH dans 69 % des CBPC [98]. Une perte allélique en 10q24-25 est observée dans 74 % des CBPC mais aucune perte n'est relevée dans les CBNPC [224, 225]. L'étude plus précise du gène MXI1 (pour *MAX Interactor 1*) localisé sur ce locus a été proposée dans les CBPC [224, 225]. Ce gène est un inhibiteur de transcription qui peut former un dimère avec MAX et entrer ainsi en compétition avec C-MYC. Cependant, aucune mutation du gène n'a été mise en évidence. Un autre gène nommé DMBT1 (pour *Deleted in Malignant Brain Tumors 1*), localisé en 10q25-26, a été proposé comme candidat pour de nombreux cancers humains, dont les cancers du poumon. Pourtant, si Wu et coll. décrivent une perte d'expression du gène dans des lignées cellulaires et tumeurs primaires de CBPC et CBNPC, Petersen en coll. ne confirment pas ce résultat [226, 227]. De plus, aucune des deux études ne met en évidence de mécanisme d'inactivation connu susceptible d'inhiber l'expression du gène, que ce soit par mutation, délétion homozygote ou méthylation.

F/ Gains récurrents

Les gains des régions 3q26-ter, 5p et 8q24 sont rapportés dans 20, 10 et 11 % des CBNPC et dans 9, 14 et 9 % des CBPC respectivement [98]. En 8q24, on trouve l'oncogène C-MYC décrit précédemment (cf chapitre IV.3.D). En 3q26, plusieurs auteurs proposent le candidat PIK3CA [228, 229]. Ce gène est une phosphatidylinositol 3-kinase dont la sur-expression peut faciliter la migration des cellules de l'épithélium respiratoire [230]. Dans les deux régions gagnées 3q26 et 5p15, nous retrouvons les gènes TERC et TERT, composant à eux deux l'enzyme télomérase impliquée dans la conservation des extrémités télomériques. La sur-expression de TERT est directement liée à l'amplification du gène dans les CBNPC et s'associe à un mauvais pronostic [231]. Enfin, le gène SKP2 (*S-phase kinase-associated protein 2*), localisé en 5p13, induit la dégradation de CDKN1b, faisant de lui un proto-oncogène fort, déjà décrit comme sur-exprimé dans les CBNPC [232].

V. Apport de la transcriptomique pour l'étude de la carcinogenèse pulmonaire

Les altérations génétiques et épigénétiques à l'origine du développement tumoral vont provoquer une dérégulation de l'expression génétique, que ce soit la sur-expression d'un oncogène, la perte d'expression d'un gène suppresseur de tumeur ou la dérégulation de gènes habituellement sous le contrôle des gènes altérés. En étudiant le niveau d'expression d'un maximum de gènes à travers la quantification des ARN messagers (ARNm) présents dans une tumeur, il est possible de définir un profil transcriptomique. Cette étude globale du transcriptome, rendue possible par la technique des « puces à ADN », est devenue un atout majeur pour la caractérisation tumorale. Au niveau fondamental, cette approche permet d'aboutir à une meilleure compréhension des événements moléculaires critiques à l'initiation et à la progression tumorale. L'identification de gènes clés dans le processus d'oncogenèse peut également déboucher sur l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Les profils moléculaires peuvent aussi apporter une information prédictive sur le potentiel métastatique d'une tumeur [233] ou sa capacité à répondre ou à résister à un traitement (pour revue, Ramaswamy et Golub 2002, Schmidt et Begley 2003) [234, 235]. Enfin, l'établissement de ces cartes d'identité moléculaire peut déboucher sur une classification plus fine des tumeurs, reflétant l'hétérogénéité de façon plus fiable que ne le font les paramètres histocliniques actuels.

1. Les puces à ADN dans l'étude des tumeurs pulmonaires

L'élaboration d'un profil transcriptomique par les puces à ADN a permis d'identifier des centaines de gènes différentiellement exprimés dans les tumeurs pulmonaires humaines comparées à du tissu pulmonaire normal. Heighway et coll. ont analysé 39 CBNPC pour rechercher les gènes cibles de la carcinogenèse pulmonaire [236]. Au total, 96 gènes sont sur-exprimés et 178 gènes sont sous-exprimés dans les tumeurs par rapport au tissu témoin. Certains de ces gènes sont impliqués dans le cycle cellulaire (*cell division cycle 2* ou CDC2, R-Ras) et la régulation transcriptionnelle (*Kruppel-like factor 4* ou KLF4), deux processus cellulaires largement altérés par dérégulation transcriptomique dans de nombreux autres types de tumeurs [237]. Parmi les autres gènes dérégulés, MMP1 (de la famille des métalloprotéinases matricielles) et l'ADN topoisomérase II sont sur-exprimées. S100A2 et la serpine B5, qui sont souvent sous-exprimés et désignés comme potentiels gènes suppresseurs de tumeur dans les tumeurs du sein et de la prostate, sont ici sur-exprimés. Pour expliquer

cette différence d'expression, les auteurs mettent en cause, non seulement la nature des tumeurs analysées, mais aussi les variations dans les méthodes d'analyse et les références utilisées. Ces données révèlent l'importance de rechercher des spécificités propres à chaque type de tumeurs et confirment la nécessité de définir précisément le protocole d'analyse et le contexte d'étude.

La plupart des différents types histologiques de tumeurs pulmonaires humaines ont été analysés sur puces à ADN au regard de tissu normal afin de pouvoir définir des spécificités propres à chaque groupe.

A/ Profil transcriptomique des carcinomes à petites cellules

A travers l'étude du profil transcriptomique, les CBPC montrent une dérégulation de nombreux gènes de la différenciation neuroendocrine. Le marqueur de la différenciation neuronale ASCL1 (*achaete-scute complex homolog 1*) et L-MYC sont fortement exprimés dans l'ensemble des CBPC [238]. La sur-expression des marqueurs neuroendocrines, tels que le gène INSM1 (pour *Insulinoma-associated gene 1*), la chromogranine A (CHGA), la GRP (pour *gastrin-releasing peptide*), est également observée [239]. La majorité des gènes sur-exprimés dans ces tumeurs par rapport au tissu sain sont retrouvés dérégulés de la même manière dans les lignées cellulaires et xénogreffes de CBPC humains [240]. Bangur et coll. ont restreint leur analyse aux gènes exprimés dans les CBPC et quasiment inexprimés dans un grand nombre de tissus sains [241]. Par cette analyse, la GRP et ASCL1 sont de nouveau ciblés, ainsi que l'ADN topoisomérase II (TOP2) et le marqueur glandulaire CEA (pour *carcinoembryonic antigen gene*). Des protéines de la famille des SOX, impliquées dans le développement embryonnaire, sont pour la première fois associées aux CBPC mais leur rôle dans le développement de ces tumeurs neuroendocrines reste à déterminer.

B/ Profil transcriptomique des carcinomes épidermoïdes

Le profil transcriptomique qui caractérise les Sq inclut la sur-expression de gènes codant pour des protéines antioxydantes et des protéines de détoxification, telles que la glutathion S-transférase (GST), la carboxyle estérase lipase (CEL) et la peroxirédoxine 1 (PRDX1) [242]. Ces données permettent de supposer que les Sq pourraient être le résultat de la réponse cellulaire de l'épithélium bronchique aux agressions chroniques par les carcinogènes de l'environnement. Les Sq expriment aussi fortement le gène P63 [239], un gène de la famille de TP53 essentiel à la formation de l'épithélium squameux. Bien que les listes de gènes obtenues par les différentes études transcriptomiques soient variables selon le

type d'analyse effectué, elles montrent des gènes communs, qui ont une forte probabilité d'être impliqués dans le développement des Sq chez l'homme. Ces gènes incluent des marqueurs épithéliaux tels que les kératines 5, 6 et 17, le gène S100A2 impliqué dans la régulation de la prolifération et de la différenciation, les desmoplakines (DSP) et desmoglénines (DSG) liées à l'adhésion des cellules épithéliales, des gènes de la formation de la matrice osseuse tels que l'ostéopontine (OPN), l'ostéonectine (OSN), et des facteurs spécifiques des ostéoblastes (OSF) qui ont encore un rôle inconnu dans le développement des Sq [238, 239, 243, 244].

Une recherche de gènes exprimés différenciellement entre 6 Sq et 4 poumons normaux par une technique de puces à ADN sur membranes de nylon a également été menée [245]. Au total, 19 gènes sur-exprimés dans les tumeurs par rapport au tissu sain ont été détectés. Parmi ces gènes, certains n'ont encore jamais été suspectés dans le développement des Sq, ils interviennent dans le contrôle de la prolifération cellulaire (G2 cycline), la transduction du signal (SMARCC2, TM4SF3), l'apoptose (CFLAR/FLIP pour *CASP8 and FADD-like apoptosis regulator*), le cytosquelette (S100A10, alpha-tubuline 1...), ou encore l'invasion cellulaire (cathepsines H et O). Cependant, aucun gène commun n'est retrouvé entre les différentes approches techniques, soulignant la complexité de ces analyses.

C/ Profil transcriptomique des adénocarcinomes

Les AC présentent une grande hétérogénéité en terme de profil transcriptomique. L'étude de Bhattacharjee et coll. révèle en effet quatre sous-groupes de AC [239]. Un premier groupe de tumeurs peu différenciées exprime fortement des gènes de la prolifération et de la division cellulaire, dont PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*). Le deuxième groupe semble avoir des caractéristiques neuroendocrines avec des marqueurs communs aux CBPC, tels que la dopa décarboxylase (DDC) ou ASCL1. Ces tumeurs sont associées à un mauvais pronostic. Le troisième groupe se compose de tumeurs plus différenciées, qui expriment les marqueurs des pneumocytes II tels que TTF1 (facteur de transcription thyroïdien impliqué dans la régulation des gènes du surfactant), la mucine 1 (MUC1) et les surfactants B et C (SFTP). Un dernier groupe intermédiaire exprime à la fois des facteurs neuroendocrines et des marqueurs alvéolaires. Trois sous-groupes de AC ont également été identifiés au cours d'une autre étude [238] : un groupe très différencié exprimant les gènes relatifs au surfactant (TTF1, surfactant A1, B et C, pronapsine A...), un groupe indifférencié exprimant des gènes impliqués dans le remodelage extracellulaire et l'angiogenèse tels que l'activateur de plasminogène (PLAU) et VEGF C, et un troisième groupe intermédiaire portant les

marqueurs décrits dans les groupes 1 et 2. L'ensemble de ces données montre que, les AC peuvent soit présenter une différenciation marquée, relative à l'épithélium pulmonaire terminal (marqueurs des pneumocytes II et cellules de Clara), soit rester peu différenciés et sur-exprimer des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la réplication d'ADN, les rendant particulièrement agressifs. Takeuchi et coll. observent d'ailleurs deux principaux groupes de AC qui reflèteraient ces deux variantes de développement [246].

En considérant les AC dans leur ensemble, certains gènes sont communément retrouvés sur-exprimés dans des études distinctes. Sont fréquemment dérégulés, les gènes du surfactant qui marquent la différenciation alvéolaire, PLAU (*Plasminogen activator, urokinase*), la pronapsine A (NAPSA) et l'ornithine décarboxylase (ODC1) encore peu décrite dans le poumon [238, 239, 243].

Une étude transcriptomique comparative entre des AC et du tissu sain humain au regard de la même analyse chez la souris montre des variations d'expression équivalentes entre les deux espèces, faisant du rongeur un modèle de choix pour l'étude de la carcinogenèse pulmonaire par le transcriptome [247].

D/ Profil transcriptomique des carcinomes à grandes cellules

Les CPGC ont également été analysés dans quelques études transcriptomiques globales et se classent, pour la majorité, dans un même sous-groupe de tumeurs qui inclut des AC [238, 246]. Dans ces tumeurs, les gènes de l'adhésion cellulaire sont sous-exprimés et on observe une sur-expression des gènes du cycle cellulaire, de la réplication d'ADN et des facteurs de transcription. Dans une autre étude, le profil transcriptomique mis en évidence évoque une transition épithélium-mésenchyme qui permet aux cellules épithéliales de se dédifférencier en cellules fibroblastiques, ce qui les aiderait à quitter leur tissu d'origine [242]. Ce profil inclus la sur-expression de PLAU et la sous-expression de la cadhérine E (CDH1), d'une plakoglobuline de jonction (JUP) et de PAX8 (*Paired box gene 8*).

E/ Conclusion

La majorité des études décrites précédemment proposent une analyse transcriptomique des tumeurs au regard de tissu sain afin de définir des gènes de la carcinogenèse pulmonaire. De nombreux gènes dérégulés codent pour des protéines déjà identifiées comme marqueurs histologiques permettant de distinguer les différents types de tumeurs pulmonaires chez l'homme (kératines dans les Sq, surfactants dans les AC, marqueurs neuroendocrines dans les CBPC). Ces analyses permettent aussi de mettre en évidence de nombreux gènes qui ont un

rôle encore inconnu dans le processus de carcinogenèse pulmonaire, tels que les gènes de la matrice osseuse dans les Sq ou les protéines de la famille des SOX dans les CBPC. Au travers des analyses spécifiques à chaque type de tumeur, des gènes communs sont retrouvés dérégulés. C'est le cas de l'activateur de plasminogène dérégulé dans les AC et les CPGC, ou l'ASCL1 et le marqueur CEA que l'on retrouve dans les études des AC et des CBPC. Pour rechercher des gènes qui distinguent les différents types de tumeurs entre eux, une analyse comparative des tumeurs deux à deux est nécessaire.

2. Transcriptome et différenciation tumorale

Peu d'études proposent une approche par comparaison de tumeurs. Kituchi et coll. ont choisi d'analyser 22 AC et 14 Sq sur puces à ADN [248]. Sur les 899 gènes permettant le classement des deux types de tumeurs, deux clusters de gènes présentent un profil d'expression différentiel entre les AC et les Sq : 24 gènes sont sur-exprimés dans les AC par rapport aux Sq et 26 gènes sont, à l'inverse, sous-exprimés dans les AC par rapport aux Sq. Dans le premier groupe de gènes, la présence de SFTP, MUC1 et TTF1 confirme la différenciation glandulaire et alvéolaire des AC précédemment mise en évidence dans les études comparatives avec le poumon normal [239]. En revanche, la cathepsine H, précédemment détectée comme sur-exprimée dans les Sq par rapport au tissu sain [245], se retrouve ici sur-exprimée dans les AC par rapport aux Sq. Si les Sq expriment plus fortement la cathepsine H que le tissu normal, ils l'expriment moins que les AC.

De leur côté, Yamagata et coll. proposent une recherche de signature qui permettrait de différencier, deux à deux, les AC, les Sq et les CPGC [249]. Une signature de 27 gènes permet de classer les AC et les Sq. Dans cette signature, les kératines 5 et 13 sont retrouvées sur-exprimées dans les Sq par rapport aux AC, confirmant la prédominance de ces marqueurs dans les tumeurs épidermoïdes. Par contre, aucune signature n'a été trouvée pour distinguer les CPGC des AC ni des Sq. Ces données suggèrent que les CPGC ne forment pas un groupe génétiquement distinct des AC et des Sq. Mais le faible nombre de cas analysés (7) dans cette étude ne permet pas de conclusion robuste.

Quelque soit le type d'approche pour l'analyse du transcriptome des tumeurs, aucune étude n'a jamais porté sur les tumeurs mixtes adénosquameuses. Deux études incluent la classification de 4 ASq et 1 ASq respectivement [246, 248]. Dans la première étude, 3 ASq se

positionnent au milieu des AC et la dernière se retrouve au milieu des Sq. Dans la seconde étude, l'unique tumeur mixte est classée avec les Sq.

Si les CBPC, les AC et les Sq sont fréquemment étudiés pour l'analyse de leur profil transcriptomique, les données sur les CPGC et les ASq sont encore trop rares pour une bonne caractérisation des tumeurs.

INTRODUCTION AU PROGRAMME DE RECHERCHE

INTRODUCTION AU PROGRAMME DE RECHERCHE

A l'heure actuelle, les données épidémiologiques recueillies chez l'homme sont insuffisantes pour définir s'il existe une relation dose-effet linéaire sans seuil entre le risque de cancer du poumon et l'exposition aux rayonnements ionisants. Plus spécifiquement, l'étiologie des tumeurs pulmonaires possiblement radio-induites à de faibles doses reste difficile à caractériser étant donné la forte exposition de la population à d'autres co-facteurs carcinogènes tels que la fumée de cigarette. Quelques analyses moléculaires des gènes TP53 et K-RAS sur des tumeurs pulmonaires de mineurs d'uranium ont été menées dans le but d'identifier une éventuelle altération génétique spécifique susceptible de refléter leur étiologie. Mais des résultats discordants sur des mutations de TP53 ont lancé une polémique qui reste encore d'actualité. Aussi, les mécanismes cellulaires et moléculaires de la carcinogenèse pulmonaire radio-induite demeurent peu connus. Ces données chez l'homme ont souligné la nécessité de disposer d'un modèle d'étude chez l'animal pour poursuivre la caractérisation des mécanismes moléculaires de ces tumeurs afin d'abolir les effets potentiels d'autres carcinogènes et de travailler sur une population plus homogène. Mais jusqu'à présent, la littérature scientifique ne rapporte que peu d'études génétiques de tumeurs pulmonaires radio-induites chez l'animal.

Dans notre laboratoire, le développement d'un modèle de tumeurs pulmonaires induites chez le rat après inhalation de radon a été entrepris. Les animaux ont été exposés à des doses totales cumulées de 100 à 1500 WLM (0,5 à 7,5 Gy). Des CBNPC ont été obtenus qui sont comparables, sur le plan histologique, à ceux induits chez l'homme. Ils incluent des AC, des Sq et des ASq. Il est important de rappeler que ces dernières tumeurs dites mixtes sont très mal caractérisées chez l'homme malgré leur forte agressivité et que le modèle animal est une aubaine pour l'étude de ces tumeurs complexes.

L'objectif de ce programme de recherche est de mieux caractériser, sur le plan moléculaire, ces tumeurs pulmonaires développées chez le rat. Cette caractérisation moléculaire permettra de disposer d'un outil pour l'étude plus spécifique des tumeurs pulmonaires radio-induites qui, à terme, amènera à une meilleure compréhension des mécanismes d'induction des cancers du poumon dans le cas d'expositions humaines aux faibles doses et, peut-être, au développement d'outils pour mieux suivre et protéger les populations exposées.

Une approche cytogénétique globale par la technique de CGH a tout d'abord été menée sur l'ensemble de ces tumeurs. Cette approche doit permettre de repérer d'éventuels

pertes et gains récurrents de régions chromosomiques dans ces tumeurs et ainsi de proposer des gènes candidats potentiellement impliqués dans la carcinogenèse pulmonaire.

Au vu des résultats, j'ai choisi de cibler le locus *Cdkn2a* et d'étudier la dérégulation des voies inhibitrices du cycle cellulaire *Rb1* et *Tp53* qui sont largement décrites comme impliquées dans la carcinogenèse pulmonaire humaine et qui sont directement sous le contrôle de ce locus. Une étude moléculaire de *p16Ink4a* a été entreprise. La perte d'hétérozygotie a été étudiée par la technique de LOH et les délétions homozygotes du gène ont été recherchées par la technique de PCR quantitative sur ADN. Le taux de méthylation du promoteur de *p16Ink4a* a été analysé par pyroséquençage et la recherche de mutation du gène a été entreprise par séquençage direct. Les niveaux d'expression des transcrits *p16Ink4a*, *Rb1* et *Cdk4* ont été analysés par RT-PCR. L'expression protéique de *p16^{Ink4a}* et *pRb* a été étudiée par immunohistochimie. En parallèle, la recherche de mutation du gène *Tp53* et l'analyse d'expression des transcrits *p19Arf*, *Mdm2* et *Mdm4* ont également été menées. Ces données moléculaires, explorant les différents systèmes d'inactivation des deux principales voies régulatrices du cycle cellulaire, doivent nous permettre de définir leur rôle dans le développement des tumeurs pulmonaires radon-induites.

Enfin, une analyse transcriptomique comparative des 3 types de tumeurs induites – AC, Sq et ASq – a été menée par la technique des puces à ADN. La recherche de gènes exprimés de manière différentielle entre les différents types de tumeurs deux à deux doit permettre de comparer les tumeurs mixtes ASq aux tumeurs « pures » AC et Sq et ainsi de mieux caractériser ces tumeurs encore mal connues.

RÉSULTATS

Chapitre I

Etude des déséquilibres chromosomiques dans les tumeurs
pulmonaires radon-induites chez le rat

RÉSULTATS

Chapitre I

Etude des déséquilibres chromosomiques dans les tumeurs pulmonaires radon-induites chez le rat

Introduction

Si les analyses épidémiologiques ont montré un risque accru de développement de cancers pulmonaires après inhalation de radon, peu d'informations sont disponibles sur les altérations génétiques impliquées dans ce processus de carcinogenèse. La plupart des études se sont focalisées sur l'analyse des mutations des gènes TP53 et K-RAS du fait de leur fréquente altération dans les tumeurs pulmonaires humaines [102, 106, 129]. Cependant, dans les tumeurs associées au radon, cette fréquence est moins élevée et le débat persiste quant à l'existence de mutations spécifiques [103, 109]. Ces données soulignent la nécessité de poursuivre les analyses génétiques de ce type de tumeurs.

Chez l'homme, la réponse cellulaire au radon peut être modulée par l'exposition conjointe à plusieurs carcinogènes, ce qui justifie l'utilisation d'un modèle animal pour approfondir nos connaissances sur la carcinogenèse pulmonaire radon-induite. Le modèle de tumeurs pulmonaires développé au laboratoire chez le rat après inhalation de radon (annexe 1), permet de travailler sur des tumeurs histologiquement similaires aux tumeurs pulmonaires humaines [85], à l'exception des carcinomes à petites cellules qui ne se développent pas chez le rongeur [83]. Dans ce chapitre, nous présenterons l'analyse de ces tumeurs par la technique de CGH qui nous a permis de définir des déséquilibres chromosomiques récurrents et de proposer des gènes candidats de la carcinogenèse pulmonaire radon-induite chez le rat.

Résultats

Cette étude a porté sur 38 tumeurs pulmonaires radon-induites chez le rat incluant 14 AC (tumeurs 1 à 14), 21 ASq (tumeurs 15 à 35) et 3 Sq (tumeurs 36 à 38). L'analyse par CGH a été effectuée comme décrit en annexe 2. La figure 13 illustre le bilan des déséquilibres chromosomiques observés dans l'ensemble des tumeurs. Globalement, ces profils CGH mettent en évidence des pertes et gains de nombreuses régions chromosomiques suggérant l'existence de remaniements cytogénétiques complexes dans ces tumeurs. Certaines tumeurs

n'ont aucun déséquilibre chromosomique (cas 5 et 29) tandis que la tumeur 21 présente un maximum de 19 régions chromosomiques affectées. Aucune différence significative dans le nombre de régions impliquées n'est observée entre les AC et les ASq, l'effectif des Sq étant trop faible pour être statistiquement pertinent.

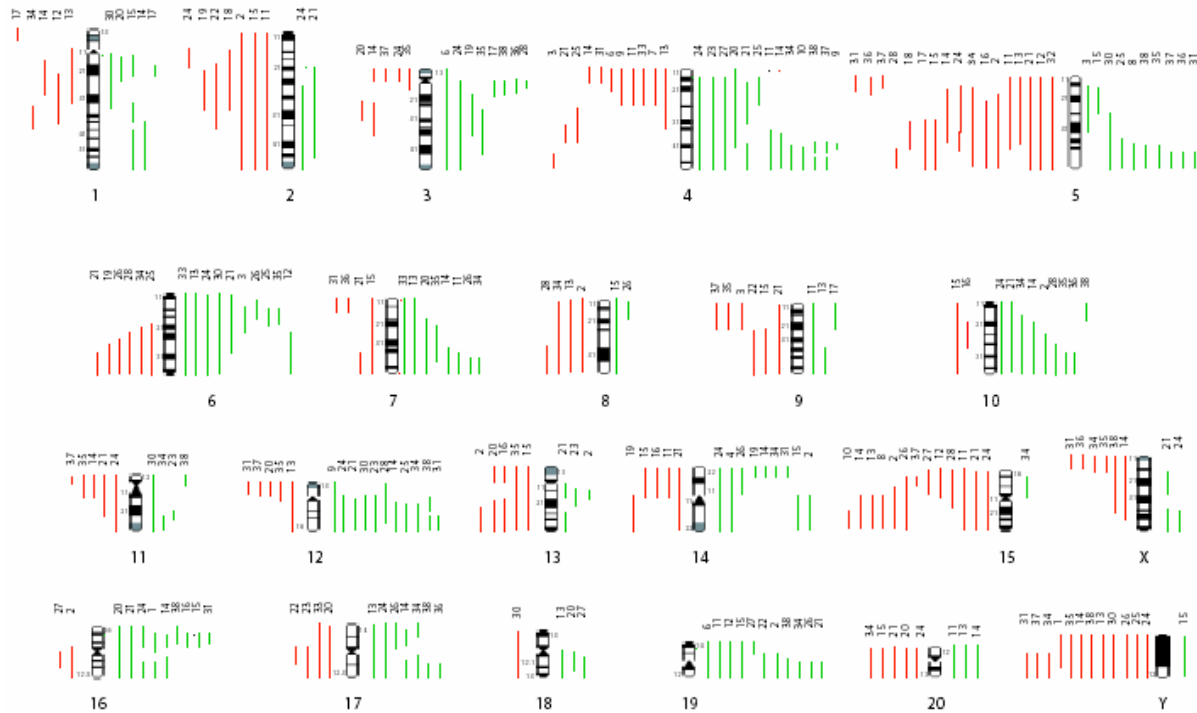


Figure 13 Vue d'ensemble des déséquilibres chromosomiques détectés en CGH dans les 38 tumeurs pulmonaires radon-induites de rat. Les idéogrammes de chromosomes de rat correspondent à un marquage en bande G. Les lignes rouges et vertes, situées de part et d'autre des idéogrammes, représentent respectivement les pertes et les gains de matériel génétique.

Pour chaque gain ou perte, la plus petite région commune à un maximum de tumeurs a été définie. Des pertes fréquentes de matériel génomique ont été observées sur les chromosomes autosomaux de rat dans les régions 5q31-35, 15q, 15p14-15 et 4q11-12. Les gains les plus fréquemment observés se situent dans les régions 4q41-ter, 19q, 6q13-15 et 12q15-ter.

Discussion

Les progrès sur la connaissance du génome de rat et l'élaboration de cartes comparées rat/souris/homme ont permis une analyse génomique comparative des tumeurs pulmonaires développées chez l'animal et chez l'homme. Les analyses cytogénétiques et moléculaires de

CBNPC humains mettent en évidence un karyotype complexe avec de nombreux réarrangements et des altérations récurrentes telles que des pertes en 3p, 9p, 13q et 17p et des gains en 3q, 5p et 8q [98, 250, 251]. Ces données cytogénétiques humaines fournissent ainsi une base pour l'analyse des tumeurs pulmonaires radon-induites chez le rat.

Une délétion de la région chromosomique 5q31-35 est détectée dans 34 % des tumeurs pulmonaires radon-induites de rat. Cette région est homologue au 9p21-23 humain délété dans 83 % des CBNPC [98]. Les loci CDKN2a et CDKN2b, qui y sont localisés, sont les cibles de LOH dans 40 à 50 % des tumeurs chez l'homme et chez le rongeur [128, 147]. Ils codent pour les gènes suppresseurs de tumeurs p16INK4a, p19ARF et p15INK4b qui sont impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire et qui ont été associés au développement et à la progression des CBNPC. Le gène p16INK4a, altéré dans 70 % des CBNPC humains et murins, est inactivé par délétion homozygote dans 40 % des cas [134, 150] ou par la méthylation de son promoteur dans 50 % des cas en moyenne [140, 151]. Le gène p19ARF est inactivé par délétion homozygote dans 30 % des CBNPC [135], la méthylation du gène étant rare. Quant à p15INK4b, sa méthylation a été décrite dans 11 % des CBNPC [160]. L'implication potentielle du locus Cdkn2a dans notre modèle mérite donc d'être étudiée et plus particulièrement, celle du gène p16INK4a.

Le bras long du chromosome 15 de rat (15q) est une région délétée dans 23 % des tumeurs de cette étude, qui est homologue au 13q14-32 humain. En 13q14.2 se trouve le gène suppresseur de tumeur RB1 qui subit une perte allélique dans 47 à 62 % des CBNPC [128, 163]. Cependant, si la mutation du second allèle est détectée dans les CBPC, l'inactivation du gène est plus rare dans les CBNPC [250]. La région 13q21 est aussi fréquemment perdue chez l'homme (65 %) [98]. Le gène PCDH20 (Protocadhérine 20), localisé en 13q21.2, est inactivé par hyperméthylation dans 54 % des lignées de CBNPC [221]. Ce gène potentiellement impliqué dans la carcinogenèse pulmonaire représente donc un autre candidat possible de la délétion du 15q chez le rat.

La région 15p14-15 perdue dans 21 % des tumeurs de rat est homologue au 3p14 humain où des pertes alléliques fréquentes ont été repérées par LOH dans les tumeurs pulmonaires [192]. Le gène suppresseur de tumeurs FHIT (*Fragile Histidine Triad*) a été proposé comme gène candidat de cette région dans les CBNPC humains, où la perte allélique et la méthylation du gène sont détectées dans 58 % et 37 % des cas respectivement [128, 196, 197] et où la perte de la protéine est corrélée à une forte prolifération et une diminution de l'apoptose [198].

Une délétion du 4q11-12 est observée dans 18 % des tumeurs de rat, délétion qui marque une spécificité d'espèce car la perte de la région homologue 7q21-ter est rare dans les cancers

pulmonaires humains [251]. Il est nécessaire de préciser que les homologies rat-homme proposées par les cartes comparées ne sont pas totales et que quelques gènes peuvent différer entre deux régions dites homologues. Aussi, la délétion du 4q11-12 chez le rat pourrait favoriser l'inactivation d'un gène qui n'est pas localisé en 7q21-ter chez l'homme. Dans le cas d'un gène cible commun aux deux régions homologues, une autre hypothèse est la présence de gènes vitaux, dans la région humaine, qui rendrait la délétion non viable pour la cellule. L'oncogène HGF (*Hepatocyte growth factor*) a été localisé en 4q12 chez le rat. Il code pour une protéine multifonctionnelle qui stimule la mobilité et l'invasion des cellules épithéliales, suite à l'interaction avec son récepteur transmembranaire c-Met. L'amplification du complexe HGF/c-Met est parfois associée au développement des tumeurs pulmonaires [252], cependant, l'altération de HGF seul ou sa délétion n'ont jamais été décrites. Ceci suggère la présence d'un autre gène candidat dans la région 4q11-12 qui reste à identifier.

La délétion du 17p et la mutation du gène TP53 ont été fréquemment décrites dans les CBNPC humains [98, 102]. Dans notre série de tumeurs pulmonaires, aucun déséquilibre récurrent au niveau de la région 10q24, porteuse du gène Tp53, n'a été observé. Cette absence d'altération visible pourrait être le reflet de la faible résolution de la CGH sur métaphases, qui est de 10 à 20 Mb pour les délétions et de 2 Mb pour les amplifications. Une autre hypothèse serait que la perte du gène Tp53 dans les tumeurs de rat nécessite la perte d'une région du chromosome 10 incompatible avec la survie cellulaire, tandis que chez l'homme, la perte de l'extrémité 17p est viable et suffisante pour la perte allélique de ce gène. Enfin, cette différence entre les deux espèces pourrait également s'expliquer par l'absence de mutation de Tp53 dans les tumeurs pulmonaires radon-induites de rat, comme précédemment décrit dans les tumeurs pulmonaires de rat en général [146]. Afin de mieux définir le niveau d'implication du gène Tp53 dans la carcinogenèse pulmonaire radon-induite chez le rat, une recherche des mutations affectant ce gène a été entreprise dont les résultats seront décrits au chapitre suivant.

Le gain du 4q41-ter est retrouvé dans 26 % des tumeurs. Cette région en partie homologue au 12p humain, porte le proto-oncogène K-ras en 4q44. Ce gène impliqué dans la voie des MAPK favorise l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire. Une mutation activatrice, impliquant le codon 12 du gène, a été décrite dans 11 à 15 % des CBNPC [106, 129]. Chez le rat, ce gène est muté au codon 12 dans 46 % des tumeurs induites par irradiation α [116]. Afin de définir si l'altération du gène peut être la cause du gain détecté en CGH dans les tumeurs radon-induites, une analyse des mutations de K-ras a été menée dont les résultats seront décrits au chapitre III.

Les régions 6q13-15 et 7q34-ter sont gagnées dans 23 et 18 % des tumeurs respectivement. En 6q14 et 7q33 sont localisés les gènes n-Myc et c-Myc impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. La région chromosomique 8q24.12-24.13, porteuse du gène C-MYC humain, est amplifiée dans 10 % des CBNPC [98]. Ces oncogènes sont des candidats potentiels dans nos tumeurs et des analyses ADN et ARN par PCR quantitative doivent être envisagées pour définir leur niveau réel d'implication dans le développement tumoral.

Pour finir, des gains du 19q et du 12q15-ter ont été observés dans 26 et 23 % des tumeurs respectivement. Tout comme la perte de la région 4q11-12, ces gains semblent révéler une spécificité d'espèce car les régions homologues 16q22-ter et 12q24-ter chez l'homme ne sont pas décrites comme faisant partie des déséquilibres récurrents observés dans les CBNPC [98]. Ces gains suggèrent la présence d'oncogènes chez le rat qui restent à identifier.

En conclusion, les homologies observées entre les profils CGH des tumeurs pulmonaires humaines et murines indiquent qu'il existe des mécanismes communs de progression tumorale dans les deux espèces. Comme chez l'homme, l'implication du locus *Cdkn2a* chez le rat semble importante et nous a incité à entreprendre une analyse moléculaire des gènes *p16Ink4a* et *p19Arf* dans les tumeurs pulmonaires radon-induites de rat. Les résultats de cette étude sont développés au chapitre II. Par ailleurs, des déséquilibres chromosomiques propres aux tumeurs pulmonaires de rat ont été observés tels que la perte du 4q11-12 ou les gains du 19q et du 12q15-ter qui doivent orienter la recherche vers de nouveaux gènes candidats susceptibles d'aider à une meilleure compréhension de la carcinogenèse pulmonaire murine. La technique des puces CGH (CGH array) permet aujourd'hui de diagnostiquer des déséquilibres génomiques avec une résolution qui dépend uniquement de l'espacement des marqueurs déposés sur la puce (pouvant descendre jusqu'à quelque dizaines de bases). L'analyse des tumeurs par cette technique devrait aider à cibler les gènes candidats et permettre de définir d'éventuels déséquilibres non détectés par CGH conventionnelle.

Chapitre II

Analyse moléculaire des voies p16Ink4a/Rb1 et p19Arf/Tp53 dans les
tumeurs pulmonaires radon-induites chez le rat

Chapitre II

Analyse moléculaire des voies p16Ink4a/Rb1 et p19Arf/Tp53 dans les tumeurs pulmonaires radon-induites chez le rat

Introduction

Le gène suppresseur de tumeur p16INK4a est localisé sur le locus CDKN2a qui code également pour le transcrit alternatif p14ARF (appelé p19Arf chez le rongeur) [253]. Ces deux gènes sont impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, en intervenant dans les voies de régulation de RB1 et TP53, respectivement. Des altérations génétiques de p16INK4a sont détectées dans 70 % des CBNPC humains [129]. Ces altérations incluent de fréquentes pertes d'hétérozygotie, des délétions homozygotes et la méthylation du promoteur ou de l'exon 1 α du gène, mais seulement quelques rares mutations [128, 134, 136, 254]. Même si la perte allélique de p16INK4a affecte souvent le locus CDKN2a entier [135], p19ARF ne semble pas jouer un rôle majeur dans la carcinogenèse pulmonaire. Les modifications d'expression et les mutations de ce gène sont en effet rarement décrites dans les tumeurs humaines et murines [148, 154].

A notre connaissance, aucune étude sur le rôle de p16INK4a dans la carcinogenèse pulmonaire radon-induite n'a jamais été publiée, que ce soit chez l'homme ou chez l'animal. La mise en évidence d'une perte récurrente de la région chromosomique 5q31-35 dans les tumeurs pulmonaires radon-induites chez le rat, où se trouve localisé le locus Cdkn2a, nous a conduit à entreprendre une analyse moléculaire de p16Ink4a, et de la voie de régulation de Rb1 qui en découle, ainsi qu'une étude de la voie de régulation de Tp53 initiée par p19Arf.

Résultats

Le locus Cdkn2a a été examiné dans une série de 33 tumeurs incluant 12 AC, 19 ASq et 2 Sq. Plus de 50 % des tumeurs exploitables en LOH présentent une perte allélique du locus (tableau I de l'article). En revanche, la délétion homozygote de Cdkn2a, définie par la technique de PCR quantitative sur ADN, n'est observée que dans deux tumeurs (tableaux I et SII). Concernant p16Ink4a, aucune mutation somatique n'a été trouvée par séquençage direct dans la séquence codante du gène. Le niveau d'expression du transcrit p16Ink4a, déterminé par RT-PCR, est faible dans une majorité des tumeurs (tableau I) et corrèle à la présence de

LOH. Ces résultats suggèrent que p16Ink4a est le gène cible potentiel de la délétion observée au locus Cdkn2a.

Le niveau de méthylation du promoteur de p16Ink4a a été analysé par pyroséquençage [255]. Un tiers des tumeurs présente un index de méthylation significativement élevé (supérieur à 20 %), mais aucune tumeur ne révèle de méthylation intégrale du promoteur (tableau I et SIII). Les deux îlots CpG localisés près de la TATA box (CpG 4 et 5) sont les sites méthylés les plus récurrents. Néanmoins, aucune corrélation significative n'a été trouvée entre le niveau d'expression de p16Ink4a et le niveau de méthylation de chaque CpG, ni l'index de méthylation général du promoteur. Dans le poumon sain, la faible expression du gène est observée même en absence de méthylation du promoteur. En revanche, dans les lignées de cellules pulmonaires épithéliales conjointement analysées, l'absence d'expression de p16Ink4a est associée à l'hyperméthylation globale du promoteur.

Au niveau protéique, 50 % des tumeurs sont négatives pour le marquage de la protéine p16^{Ink4a} par immunohistochimie (tableau I et figure 1). Cette absence d'expression n'est cependant pas corrélée à l'expression du transcrit p16Ink4a ou à la présence de LOH.

Pour compléter l'analyse de la voie de dérégulation du cycle cellulaire initiée par p16Ink4a, l'expression des transcrits Cdk4 et Rb1 a été analysée. Aucun de ces gènes n'a été trouvé dérégulé. Pourtant, la protéine pRb est absente dans 45 % des tumeurs, et majoritairement dans les tumeurs exprimant la protéine p16^{Ink4a}.

Afin d'examiner l'inactivation possible de la voie de Tp53 par p19Arf, l'expression des transcrits p19Arf, Mdm2 et son apparenté Mdm4 a été analysée (tableau I). Le gène p19Arf est exprimé dans toutes les tumeurs à un niveau plus élevé que dans le poumon sain. Aucune corrélation n'a été trouvée entre l'expression des transcrits p19Arf et p16Ink4a. Les gènes Mdm2 et Mdm4 ne sont pas surexprimés dans les tumeurs. Les niveaux d'expression de p19Arf et de Mdm2/Mdm4 ne sont pas corrélés.

La recherche de mutation du gène Tp53 a également été entreprise pour 29 tumeurs de la série (tableau II). Les quatre mutations détectées (14 % des cas) correspondent à deux transitions A-G aux codons 124 et 134 et à deux petites délétions de 6 et 27 paires de bases. Trois de ces mutations sont supposées induire la formation de protéines inactives ou instables. L'inactivation de Tp53 par mutation est donc un événement rare dans les carcinomes de cette étude.

Discussion

L'étude de la dérégulation de p16Ink4a dans les tumeurs pulmonaires radon-induites chez le rat a été entreprise au vu de la perte fréquente de la région chromosomique 5q31-35 par CGH. L'analyse immunohistochimique de la protéine p16^{Ink4a} révèle que 50 % des tumeurs sont négatives. Nous avons donc recherché l'origine de cette perte d'expression protéique. L'étude de LOH au locus Cdkn2a a permis de découvrir que 50 % des tumeurs analysables présentent une perte d'hétérozygotie corrélée à une diminution de l'expression du transcrit p16Ink4a. Par contre, comme précédemment décrit chez le rongeur [147, 150, 256], les pertes bialléliques sont rares et ne concernent ici que 2 tumeurs. L'absence de mutation du gène p16Ink4a dans notre série de tumeurs est également en accord avec les données de la littérature où les mutations du gène sont rapportées dans de rares cas chez l'homme [130, 136, 257] et n'ont jamais été détectées chez le rongeur [148, 149, 155]. L'inactivation de p16INK4a par méthylation de son promoteur est fréquemment décrite chez l'homme et le rongeur [148, 258-260]. Cependant, l'effet inhibiteur de la méthylation sur l'expression du gène n'est pas toujours vérifié [138, 149]. Les analyses de méthylation du promoteur de p16Ink4a disponibles chez le rongeur montrent des variabilités. Dans certaines tumeurs pulmonaires primaires, le niveau de méthylation sur l'ensemble de la séquence promotrice de p16Ink4a est fortement corrélé au niveau d'expression du gène [149, 259]. Par contre, pour Honoki et coll., seule la méthylation des îlots CpG proches de la séquence TATA box dirige la régulation de l'expression de p16Ink4a dans des lignées cellulaires de AC [141]. Dans la majorité des tumeurs radon-induites analysées ici, nous observons un niveau de méthylation plus élevé pour les îlots CpG proches de la TATA box, pourtant, aucune corrélation de l'expression du gène avec la méthylation de ces CpG n'a été trouvée ni même de corrélation avec l'index de méthylation général du promoteur. Par contre, dans les lignées de cellules pulmonaires épithéliales étudiées, la corrélation est forte entre l'index de méthylation et le niveau d'expression de p16Ink4a. Ces résultats suggèrent que dans nos tumeurs, l'expression de p16Ink4a n'est pas directement régulée par la méthylation de son promoteur tandis qu'*in vitro*, ce mécanisme de régulation semble jouer un rôle majeur.

En raison de la perte mono-allélique récurrente de p16Ink4a, associée à une faible expression du transcrit, un mécanisme d'haploinsuffisance a été envisagé, qui a précédemment été décrit chez la souris « *knock-out* » (portant un gène invalide) pour de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs [261]. Cependant, aucune corrélation n'est mise en évidence entre la LOH et l'expression de la protéine p16^{Ink4a}, indiquant que la LOH n'est pas suffisante pour induire la

diminution d'expression de la protéine. Un autre mécanisme d'inactivation du gène a été mis en évidence dans un modèle de fibroblastes de souris : une répression de l'expression des gènes p16Ink4a et p19Arf a été observée sous l'action du gène Bmi1, répresseur transcriptionnel du groupe des polycombes [262]. Dans les CBNPC humains, une corrélation inverse entre l'expression de p16INK4a et de BMI1 a également été décrite [263, 264], suggérant que la sur-expression du gène polycombe pourrait être un mécanisme alternatif de la dérégulation de p16INK4a dans les tumeurs pulmonaires. Les résultats d'expression de Bmi1 obtenus par PCR quantitative dans les tumeurs radon-induites de rat (Rn01487363_m1, Applied Biosystems), n'ont cependant pas permis de mettre en évidence de corrélation avec l'expression de p16Ink4a. En conclusion, pour la série de tumeurs analysées dans cette étude, ni la délétion homozygote, ni la perte allélique, ni la mutation, ni la méthylation du promoteur, ni l'expression de Bmi1 ne jouent de rôle prépondérant dans l'inactivation de p16Ink4a.

Une régulation de p16Ink4a par la voie de Rb1 a également été décrite : l'inactivation de pRb, par la surexpression de Cdk4, peut induire la surexpression de p16Ink4a [142]. Dans notre série, 45 % des tumeurs n'expriment pas la protéine pRb. Par contre, Cdk4 n'est jamais surexprimé. Néanmoins, l'expression des protéines p16^{Ink4a} et pRb ont tendance à être inversement corrélées, corrélation que l'on retrouve fréquemment décrite dans les tumeurs pulmonaires humaines [129, 265]. Ces données semblent indiquer que la voie p16Ink4a/Rb1 joue un rôle majeur dans le développement de ces tumeurs, entre autre par la perte d'expression de la protéine p16^{Ink4a}, mais aucun mécanisme connu d'inactivation du gène ne semble majoritairement impliqué.

La régulation de p19Arf, transcrit alternatif du locus Cdkn2a, et de la voie p19Arf/Mdm2/Mdm4/Tp53 est aussi examinée. Le gène p19Arf n'est pas sous-exprimé tandis que Mdm2 et Mdm4 ne sont jamais sur-exprimés. Contrairement aux tumeurs pulmonaires humaines [266], la dérégulation de p19Arf ou Mdm2/Mdm4 ne joue pas de rôle majeur dans le développement de ces carcinomes. Le faible taux de mutation du gène Tp53 (14 %) indique également que l'inactivation directe du gène suppresseur de tumeur est rarement impliquée dans la carcinogenèse pulmonaire radon-induites chez le rat, en accord avec les données de la littérature sur les tumeurs pulmonaires murines. Il est toutefois intéressant de noter que les mutations observées comprennent de courtes délétions qui ont précédemment été observées plus fréquemment dans les tumeurs radio-induites que dans les tumeurs sporadiques [267, 268], révélant une possible signature de la carcinogenèse radio-induite.

En conclusion, dans cette série de tumeurs pulmonaires radon-induites chez le rat, la voie de régulation du cycle cellulaire p16Ink4a/Rb1 se caractérise par une fréquente perte de la protéine p16^{Ink4a}. Cependant, aucun des mécanismes d'inactivation de cette voie n'intervient de manière récurrente dans ces tumeurs et l'origine de cette perte d'expression protéique reste à déterminer.

Par cette étude du profil moléculaire des gènes suppresseurs de tumeur p16Ink4a, Rb1 et Tp53, il apparaît qu'aucun des types histologiques ne présente de spécificité, les altérations de p16Ink4a et Rb1 étant retrouvées indifféremment dans les trois types de tumeurs représentés. Pourtant, doit-on attendre des spécificités moléculaires pour chaque type de tumeur ? Si l'on sait que les AC et les Sq ont des spécificités propres, telles que les marqueurs de différenciation glandulaire et squameuse, aucune spécificité moléculaire des tumeurs mixtes n'a encore été mise en évidence. Afin d'approfondir nos connaissances sur les ASq, nous avons développé une analyse transcriptomique de ces tumeurs que nous présentons au chapitre suivant.

Article

Molecular analysis of the Ink4a/Rb1 - Arf/Tp53 pathways in radon-induced rat lung tumors



Contents lists available at ScienceDirect

Lung Cancer

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lungcan



Molecular analysis of the Ink4a/Rb1–Arf/Tp53 pathways in radon-induced rat lung tumors

Kristell Bastide^{a,*}, Marie-Noëlle Guilly^a, Jean-François Bernaudin^b, Christophe Joubert^c, Bruno Lectard^a, Céline Levalois^a, Bernard Malfoy^{d,e,f}, Sylvie Chevillard^a

^a CEA, DSV, IRCM, SREIT, Laboratoire de Cancérologie Expérimentale, BP6, Fontenay-aux-Roses Cedex F-92265, France

^b Service d'Histologie-Biologie Tumorale, Unité Propre de Recherche de l'Enseignement Supérieur EA 3499, Université Paris 6, Hôpital Tenon, Paris F-75020, France

^c CEA, DSV, I2BM, MIRCEN, Laboratoire de Biologie Appliquée, BP6, Fontenay-aux-Roses Cedex F-92265, France

^d Institut Curie, Centre de Recherche, Paris F-75248, France

^e CNRS, UMR 7147, Paris F-75248, France

^f Université Paris VI, Paris F-75248, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 January 2008

Received in revised form 10 April 2008

Accepted 5 June 2008

Keywords:

Lung cancer

Radon

Rat

Ink4a

Rb1

Arf

Tp53 mutation

ABSTRACT

Inhalation of radon is closely associated with an increased risk of lung cancers. While the involvement of Ink4a in lung tumor development has been widely described, the tumor suppressor gene has not been studied in radon-induced lung tumors. In this study, loss of heterozygosity (LOH) analysis of the Cdkn2a locus, common to the Ink4a and Arf genes, was performed on 33 radon-induced rat lung tumors and showed a DNA loss in 50% of cases. The analysis of p16^{Ink4a} protein expression by immunohistochemistry revealed that 50% of the tumors were negative for this protein. Looking for the origin of this lack of expression, we observed a low frequency of homozygous deletion (6%), a lack of mutation, an absence of correlation between promoter methylation and Ink4a mRNA expression and no correlation between LOH and protein expression. However, a tendency for an inverse correlation between p16^{Ink4a} and pRb protein expression was observed. The expressions of p19Arf, Mdm2 and Mdm4 were not deregulated and only 14% of the tumors were mutated for Tp53. These results indicated that Ink4a/Cdk4/Rb1 pathway deregulation, more than Arf/Mdm2/Tp53 pathway, has a major role in the development of these tumors through p16^{Ink4a} deregulation. However, all known mechanisms of inactivation of the pathway do not play a recurrent role in these tumors and the actual origin of the lack of p16^{Ink4a} protein expression remains to be established.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Radon (Rn) and Rn daughters are alpha transmitters closely associated with an increased risk of lung cancer in humans [1,2] and rodents [3]. The inhaled particles cause DNA damage in lung cells through double-strand breaks [4] leading to somatic mutations, as mutations of TP53 described after radon exposure in an uranium miner cohort [5]. DNA damage could be one factor initiating aberrant promoter methylation and gene silencing of multiple cell cycle regulators [6], including INK4a, which was inactivated by hypermethylation in adenocarcinomas from plutonium-exposed workers at Mayak [7]. The tumor suppressor gene INK4a is localized in the CDKN2A locus, which also codes, through an alternative splicing, for another tumor suppressor gene ARF [8]. The wild-type protein

p16^{INK4a} interacts with CDK4 and induces G1 arrest by inhibiting the phosphorylation of pRb. The wild-type protein p14^{ARF}, also known as p19^{Arf} in rodents, facilitates TP53 transcriptional activity by inhibiting two of its inhibitors, MDM2 and MDM4, and consequently contributes to the cell cycle arrest in both G1 and G2/M phases. In human non-small cell lung carcinoma (NSCLC), genetic alterations of INK4a are detected in about 70% of cases [9]. These alterations include frequent loss of heterozygosity (LOH) [10,11] and gene silencing by promoter or exon 1 methylation [12–14], but only a few somatic mutations. In human tumors, the frequent INK4a allelic loss often affects the whole CDKN2A locus [15]. Nevertheless the ARF gene does not seem to play a major role in lung carcinogenesis since altered gene expression or mutations of the gene are rarely described in human and rodent tumors [16,17]. To our knowledge, no analysis of the role of the INK4a in radon-induced lung carcinogenesis has been published, although this gene is widely involved in lung carcinogenesis in general [18]. However, by comparative genomic hybridization (CGH) analysis of a large series

* Corresponding author. Tel.: +33 1 46 54 94 26; fax: +33 1 46 54 88 86.
E-mail address: kristell.bastide@cea.fr (K. Bastide).

of radon-induced rat lung tumors, we previously found a recurrent loss of the 5q11–33, chromosomal region which overlaps the *Cdkn2a* locus [19]. In the present study, we focus on genetic analyses of the cell cycle regulatory *Ink4a*/Rb1 and *Arf*/Tp53 pathways, to define their roles in radon-induced rat lung carcinogenesis.

2. Materials and methods

2.1. Biological samples

Thirty-three primary rat lung carcinomas occurred in a large series of lifespan experiments carried out in our laboratory on outbred Sprague–Dawley rats and hybrid Wistar Furth/Fischer F344 rats (Iffa Credo, France) after radon progeny inhalation at 100 and 1500 WLM (Working Level Month), respectively [20]. Animals were handled according to the French Legislature and the European Directives regarding the care and use of laboratory animals. A portion of each lung tumor was used for histological diagnosis, an other was kept frozen for further DNA and RNA extraction. Two normal lung tissues (L1 and L2) and two rat lung epithelial cell lines (R1 and R2), previously developed in the laboratory [21], were also used. RNA was isolated using RNeasy according to the manufacturer's protocol (MP Biomedicals) and genomic DNA was extracted by the standard phenol chloroform procedure.

2.2. Allelic status of the *Cdkn2a* locus

For all hybrid rat tumors (19/33), LOH was analyzed using polymorphic markers D5Rat21 (located at 5q31, 9.5 Mb proximal to *Cdkn2a* locus) and D5Rat83 (located at 5q34, 16.6 Mb distal to *Cdkn2a* locus) selected from the Rat Genome Database (RGD: <http://rgd.mcw.edu>). These markers were homozygous in Sprague–Dawley rats. PCR primers and conditions were available on request. PCR products were analyzed by capillary electrophoresis on the ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems). Quantization of peak size (height and area) was performed using Genescan 3.1 and Genotyper 2.0 softwares (Applied Biosystems). LOH was considered as significant if the allelic peak height ratio or area ratio ($T1/T2$)/(N1/N2) was lower than 0.65, where N and T are normal and tumor samples 1 and 2 identify the two alleles.

2.3. Homozygous deletion of the *Ink4a* gene

Homozygous deletions were investigated in the three exons of the *Ink4a* gene. Five nanograms of total DNA from tumors and normal control were used for *Ink4a* segment amplification according to the Power Sybr Green PCR master mix kit procedure (Applied Biosystems). A segment localized in the *Gusb* gene was used for calibration. The sequence of the primers and the PCR conditions are listed in Table S1. PCR was performed in duplicate using a 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems). The threshold cycle numbers (Ct) were determined for all DNA samples and all segments. The difference in Ct between tumor DNA and normal control DNA was calculated for each *Ink4a* segment (ΔCt_{p16}) and the *Gusb* segment (ΔCt_{gus}). $\Delta \Delta Ct$ corresponding to $\Delta Ct_{p16} - \Delta Ct_{gus}$ was then calculated. $\Delta \Delta Ct$ higher than 3.5 indicated a homozygous deletion.

2.4. *Ink4a*, *Arf*, *Rb1*, *Cdk4*, *Mdm2* and *Mdm4* mRNA expression

cDNA was synthesized from total RNA using MMLV superscript enzyme (Invitrogen). PCR was done in duplicate using the Syber Green DNA PCR Core Reagent Kit and a 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems). The sequence of the primers and the PCR conditions are listed in Table S1. Primers used for *Ink4a* were designed

by Abe et al. [22]. *Rb1* and *Mdm4* were analyzed with taqman probes-based assays (Rn1753323.m1 and Rn01487363.m1, respectively, Applied Biosystems). Normalization was performed using the expression of the housekeeping *Gusb* gene (Rn00566655.m1, Applied Biosystems).

2.5. *Ink4a* gene mutation

The three exons of the *Ink4a* gene were sequenced in both directions on DNA and/or cDNA by the Premium Read service of GENOME Express (Meylan, France) after PCR amplification using primers and conditions specified in Table S1.

2.6. *Ink4a* promoter methylation

Ink4a promoter methylation was determined by the pyrosequencing assay standard service of the Biotage company (Uppsala, Sweden). The EZ DNA Methylation KitTM (Zymo Research) was used for bisulfite treatment of tumor and control DNA. A segment of 475 bp was analyzed, located in 5' of the transcription start of exon 1 α and containing 20 CpGs. The sequence was amplified in three fragments using the primers listed in Table S1. Pyrosequencing analysis was performed on the PCR products (sequencing primers are available on request). The percentage of methylation of each CpG was determined for all cases. The methylation index (Mtl) of the segment was calculated as the mean of the percentage of methylation at all CpGs divided per 100.

2.7. Immunohistochemical staining of p16^{Ink4a} and pRb

Immunohistochemical detection of p16^{Ink4a} and pRb was performed on 4 μ m deparaffinized and rehydrated sections treated with 3% hydrogen peroxide. Antigenic sites were exposed by incubating slides 24 h at room temperature in citrate buffer 100 mM pH 6 for p16^{Ink4a} or heating 15 min on EDTA 1 mM pH 8 for pRb. Incubation with the mouse monoclonal antibody anti-p16 (F-12) (1:200, Santa Cruz Biotechnology) or the mouse monoclonal antibody anti-pRb (1:10, BD Biosciences Pharmingen) occurred overnight at 4°C. The anti-pRb antibody recognized all forms of the protein. A goat secondary anti-mouse biotinylated antibody (Santa Cruz Biotechnology) was applied at room temperature during 30 min for p16^{Ink4a} and 60 min for pRb at a 1:200 and 1:10 dilution, respectively. Detection of the immunoreactivity was carried out by using an Avidin–Biotin–Peroxidase amplification system according to the manufacturer's instructions (Vectastain[®] Elite ABC Kit, Vector). The slides were counterstained with hematoxylin. Negative controls were obtained after incubation of the sections in PBS instead of primary antibodies. Reactive lymphocytes and inflammatory cells served as positive internal controls. Only nuclear staining was considered as positive.

2.8. *Tp53* gene mutation

Tp53 mutations were screened by sequencing of PCR-amplified cDNA products. The full coding sequence was first amplified, and then two nested PCRs were performed using internal primers (primers and conditions of PCR are described in Table S1). Sequencing reactions were carried out on both strands using the dye dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit (Big dye Terminator sequencing kit, Applied Biosystems). The sequences were established using a capillary electrophoresis (ABI PRISM 310, Applied Biosystems) and compared with the referential sequence NC_005109 from GenBank database (NCBI). The IARC TP53 somatic mutations database R11 was used for the evaluation of the functional consequence of the mutations (www-p53.iarc.fr).

2.9. Statistical analysis

The non-parametric Mann–Whitney *U*-test was used to analyze the correlation between mRNA expression and methylation, p16^{Ink4a}/pRb immunostaining or LOH data. For expression and methylation data, categorical variables were provided by classification in two groups under and over the corresponding median. The criterion for statistical significance was $p < 0.05$. All data were analyzed using StatView statistical software V5.0 (SAS Institute Inc.).

3. Results

The Cdkn2a locus was investigated in a series of radon-induced rat lung tumors including 19 adenocarcinomas, 12 adenocarcinomas and 2 squamous cell carcinomas (Table 1). LOH analyses were performed on tumors using the closest polymorphic marker known both sides of the locus. Ten of the 19 analyzable tumors presented an LOH on both markers (Table 1). Homozygous deletion was found in tumors 14 and 16 (Table 1 and Table S2, supplementary data). So, the Cdkn2a locus was rarely biallelically inactivated in this series of tumors, but allelic loss was observed in half of the analyzed cases.

No somatic mutation was found in the coding sequence of the Ink4a gene. Ink4a mRNA was poorly or not expressed in a large proportion of the tumors as well as in normal lung tissue (Table 1). However, in rare cases (cases 5, 7 and 27), higher levels of expression were reached. Ink4a was significantly less expressed in tumors with than without LOH ($p = 0.02$).

The methylation status of the promoter region of Ink4a was analyzed by pyrosequencing (Table 1 and Table S3, supplementary data). One-third of the tumors had an Mtl between 0% and 5%, a range of methylation considered to be due to experimental background [23]. Another one-third of the tumors had a low methylated promoter (Mtl ranging from 5% to 20%). In the last third of the tumors, the level of methylation was higher, but no highly methylated promoter was observed. The two CpGs localized near the TATA box (numbers 4 and 5, Table S3) were the more recurrently methylated sites. Nevertheless, no relationship was found between the Ink4a mRNA expression and the methylation of each CpG individually or with the methylation index of the promoter region ($p > 0.3$). In normal lung tissues, the very poorly expressed gene had an unmethylated promoter. The relationship between Ink4a expression and methylation of the gene promoter was also investigated in two rat lung epithelial cell lines (R1 and R2). The very low-level gene expression was associated with global hypermethylation of the promoter, in contrast to normal tissues and lung tumors (Table 1 and Table S3, supplementary data). According to immunohistochemical staining, 16 of the 32 analyzable tumors (50%) did not express p16^{Ink4a} (Table 1 and Fig. 1). This lack of expression was not correlated neither to Ink4a mRNA expression ($p = 0.5$) nor to LOH ($p = 0.7$). Cdk4 mRNA was expressed at a low level, similar to the one observed in normal lung tissue and overexpression was never detected in tumor samples (Table 1). Rb1 mRNA was expressed in all the tumors at a basal level, lower than in normal tissue. The pRb immunostaining was negative in 13 of the 29 analyzable tumors (45%) (Table 1 and Fig. 1), but no correlation was found between Rb mRNA and protein expression levels ($p = 0.3$). No correlation was found between Ink4a and Rb1 mRNA expression ($p = 0.4$); however, an inverse correlation tendency was detected between p16^{Ink4a} and pRb expressions ($p = 0.07$).

In order to investigate possible inactivation of the Tp53 pathway via the alternative transcript Arf, the mRNA expression of Arf, Mdm2, Mdm4, and the mutation status of Tp53 were analyzed in the series of tumors. Arf mRNA was expressed in all the

tumors recurrently at a higher level than in normal lung tissue (Table 1). No correlation was found between mRNA expression levels of Ink4a and Arf ($p = 0.2$). All tumors expressed Mdm2 and Mdm4, generally at lower levels than in normal lung tissue, and no overexpression was observed (Table 1). The levels of mRNA expression of Arf and of the Mdm2 or Mdm4 genes were not correlated ($p = 0.6$ and 0.3 , respectively). Finally, mutations in the Tp53 gene were searched for by direct sequencing in 29 tumors of the series. The four detected mutations (14% of the cases) consisted of two A–G transitions at codons 124 and 134 (cases 21 and 31, respectively) and two short deletions (6 bp and 27 bp for cases 7 and 32, respectively) (Table 2). The two base substitutions were localized in the DNA fixation domain of the protein. These codons are homologous to the human codons 126 and 136, respectively. The Tyr to Cys change at codon 126 generates a non-functional protein with dominant negative properties, whereas the Gln to Arg change at codon 136 is neutral, the protein remaining functional (IARC database). The two deletions, localized in the tetramerization and in the Mdm2 fixation domains, respectively, likely induced the formation of inactive or unstable proteins. The mutations were heterozygous in three of the four cases. Thus, in case 7 with a homozygous profile, no functional Tp53 was present, whereas in case 31, both alleles were functional. In the two last cases, one allele was functional but deregulation might exist because of possible dominant negative effects. It can be concluded that the mutational inactivation of the p53 function in these carcinomas was a rare event.

4. Discussion

In this study, we focused on Ink4a deregulation in a series of radon-induced rat lung tumors because this gene is frequently altered in human, mouse and rat non-small cell lung carcinoma (NSCLC) [24–27], and moreover, our previous CGH analyses of these tumors showed a recurrent loss at 5q11–33 [19] where the gene is localized. The protein p16^{Ink4a} was unexpressed in 50% of the analyzable tumors (16/32, Table 1) and we looked for the origin of this lack of expression. In line with published data in rodents [25,28,29], the frequency of biallelic loss was low, since only two tumors presented a biallelic deletion at the Ink4a locus. The combined observations of the biallelic loss and an LOH at the locus in these tumors indicated that the homozygous deletions were smaller than the allelic loss, in good agreement with the small size of the deletions detected in human tumors [30]. The lack of mutation in the Ink4a gene in our series corroborates the literature data since mutations have been described in lung tumors only in a few cases in humans [31–33] and have never been found in rodents [17,34,35]. Another mechanism frequently described in human and rodent studies is the inactivation of INK4a by methylation of the gene promoter [6,17,24,27]. However, the relationship between reduced expression of the gene and methylation was not systematically observed [34,36]. Discrepancies may derive from the analyzed sequence, the methylation of the exon 1 α studied in early publications being less informative than the actual promoter region [22]. Experimental approaches may also generate conflicting data because analyses by methylation-sensitive restriction enzymes or methylation-specific PCR give results for one or more CpGs, whereas sequencing after bisulfite treatment provides a more complete and possibly quantitative view of the methylation status of the locus [23]. Nevertheless, presently available precise analyses of the promoter sequence of the Ink4a gene in several systems give contrasted results. In primary rodent lung tumors, variable levels of overall methylation were observed in the Ink4a promoter which were hardly related to the expression levels of the

Table 1
Summary of the radon-induced rat lung tumor analyses

Case	Histology	LOH	Ink4a				Rb1		RNA expression				Tp53
			HD	RNA expression	Mtl	Protein expression	RNA expression	Protein expression	Cdk4	Arf	Mdm2	Mdm4	
1	AC	LOH	–	0.05	0.2	p16+	1.11	Rb–	0	0.08	0.01	0.69	–
2	AC	–	–	0.64	0.11	p16–	1.21	Rb–	0.10	0.83	0.87	0.35	–
3	AC	LOH	–	0.06	0.07	p16+	0.76	Rb–	0.09	0.27	0.67	0.24	nd
4	AC	–	–	0.25	0.05	p16–	1.30	Rb–	0.38	1.26	2.13	0.7	–
5	ASC	–	–	1.54	na	p16+	1.07	Rb–	0.12	8.22	0.27	0.25	nd
6	ASC	–	–	0.05	0.34	p16+	0.98	Rb–	0.15	5.14	2.07	0.41	–
7	ASC	–	–	3.2	0.33	p16+	1.43	Rb–	0.32	22.51	3.54	0.24	Deletion
8	ASC	–	–	0.16	0.29	p16+	1.82	Rb–	0.37	2.71	0.36	0.82	–
9	ASC	LOH	–	0.42	0.2	p16+	1.29	Rb+	0.15	5.36	1.21	0.29	–
10	ASC	–	–	0.01	0.17	p16+	0.57	Rb+	0.06	0.44	0.67	0.4	–
11	ASC	LOH	–	0.07	0.08	p16–	1.01	Rb+	0.13	0.3	0.63	0.25	–
12	ASC	–	–	0.28	0.07	p16+	0.74	Rb–	0.11	0.72	0.87	0.24	–
13	ASC	LOH	–	0.24	0.05	p16+	1.64	Rb+	0.24	1.02	1.28	0.37	–
14	ASC	LOH	HD	nd	nd	p16–	2.15	Rb+	0.20	0.18	3.82	0.42	–
15	ASC	LOH	–	0.05	0.05	p16+	1.09	Rb+	0.13	0.31	0.96	0.3	–
16	ASC	LOH	HD	nd	nd	p16–	1.70	Rb+	0.2	0.73	1.16	0.29	–
17	ASC	LOH	–	0	0.05	p16–	1.28	Rb+	0.13	0.21	1.02	0.3	–
18	ASC	LOH	–	0.03	0.05	p16+	1.62	Rb+	0.19	0.12	1.22	0.38	–
19	ASC	–	–	0.39	0.04	p16+	1.65	Rb–	0.24	0.37	2.08	0.62	–
20	AC	na	–	0.15	0.42	p16–	0.53	Rb–	0.08	1.38	0.47	0.2	–
21	AC	na	–	0.46	0.22	p16+	0.80	Rb–	0.25	0.71	0.59	0.4	Transition
22	AC	na	–	0.33	0.15	p16–	1.09	Rb+	0.09	na	1.70	0.19	–
23	AC	na	–	1.01	0.12	p16–	2.82	Rb+	0.07	1.05	0.48	0.49	–
24	AC	na	–	0.08	0.09	p16–	0.51	Rb+	0.06	0.15	0.31	0.13	–
25	AC	na	–	0.11	0.08	na	0.64	na	0.03	3.68	0.84	2.44	–
26	AC	na	–	0.3	0.08	p16–	nd	Rb+	0.07	6.04	0.87	1.24	nd
27	AC	na	–	3.64	0.06	p16–	1.21	Rb+	0.13	8.69	1.06	0.32	–
28	ASC	na	–	0.23	na	p16–	0.23	Rb+	0.03	1.43	0.37	0.55	nd
29	ASC	na	–	0.15	0.57	p16+	0.56	Rb+	0.19	1.4	0.68	0.19	–
30	ASC	na	–	0.63	0.45	p16–	1.25	na	0.97	29.63	3.73	0.56	–
31	ASC	na	–	0.09	0.24	p16–	1.39	na	0.04	3.16	1.66	0.31	Transition
32	SCC	na	–	0	0.55	p16+	1.71	Rb–	0.24	3.06	1.19	0.69	Deletion
33	SCC	na	–	0.04	0.27	p16–	0.98	na	0.11	3.39	1.27	0.38	–
L1	Lung	nd	nd	0.04	0.05	nd	1.92	nd	0.20	0.06	1.76	0.66	nd
L2	Lung	nd	nd	0.03	0.05	nd	4	nd	0.17	0.10	1.28	0.66	nd
R1	Cell lines	nd	nd	0.02	0.84	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
R2	Cell lines	nd	nd	0	0.86	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Cases 1–19: hybrid Wistar Furth/Fischer F344 rat; cases 20–33: Sprague–Dawley rat; L1 and L2: control lungs; R1 and R2: rat lung epithelial cell lines; AC: adenocarcinoma; ASC: adenosquamous carcinoma; SCC: squamous cell carcinoma; LOH: loss of heterozygosity at the Cdkn2a locus; na: not available; nd: not done; HD: homozygous deletion; Mtl: methylation index; p16+ and Rb+: positive immunostaining for p16^{Ink4a} and pRb proteins; p16– and Rb–: negative immunostaining. HD was analyzed by quantitative PCR on the three exons of Ink4a; RNA expression of Ink4a, Rb1, Cdk4, Arf, Mdm2 and Mdm4 genes, measured by quantitative RT-PCR, were normalized using Gusb gene expression; methylation of the Ink4a gene promoter was analyzed by pyrosequencing (see Section 2 for Mtl calculation); mutations in the Tp53 gene were determined by sequencing.

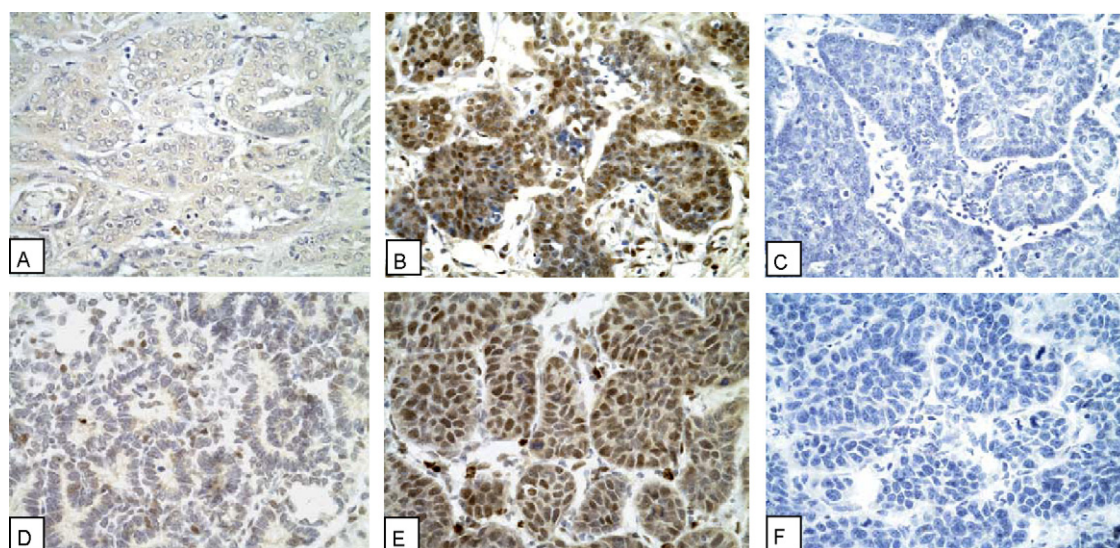


Fig. 1. Immunohistochemical staining of p16^{Ink4a} and pRb. Immunostaining patterns for p16^{Ink4a} (A–C) and pRb (D–F). (A) p16^{Ink4a} negative, (B) p16^{Ink4a} positive, (C) p16^{Ink4a} negative control, (D) pRb negative, (E) pRb positive and (F) pRb negative control. Reactive lymphocytes are positive internal controls. Magnification 40 \times .

Table 2
Mutations of the Tp53 gene

Case	LOH	Mutations	Protein
7	LOH	Co 333–334 del 6 bp	In frame del
21	–	Co 124 TAC > TGC	Y124C
31	–	Co 134 CAG > CGG	Q134R
32	–	Co 86–94 del 27 bp	In frame del

LOH: loss of heterozygosity; Co: codon; bp: base pair; del: deletion.

gene [24,34]. In contrast, the specific methylation of CpGs located near the TATA box seemed more precisely implicated in the regulation of Ink4a expression in another study in rat lung tumor cell lines [37]. In the present study, we have used a quantitative technique, based on pyrosequencing of bisulfite-modified DNA [23], to determine the methylation profile of each CpG located in the Ink4a promoter region (Table S3, supplementary data). In the radon-induced lung carcinomas, we observed that the two CpGs near the TATA box were also recurrently more methylated than the others. However, no correlation was found between the gene expression and the methylation of each CpG or with the methylation index of the whole sequence. In contrast, in rat lung epithelial cell lines, we observed a strong correlation between high methylation index and low Ink4a expression (Table 1 and Table S3). Altogether, the available data suggest that, in these tumors, Ink4a mRNA expression is not regulated by promoter methylation whereas, in lung epithelial cell lines, this type of regulation seems to have a main role. The recurrent loss of one allele of Ink4a associated to the retention of a wild-type allele and to a low level of mRNA expression could suggest haploinsufficiency, as previously described in knock-out mice for many tumor suppressor genes [38]. However, no relationship was found between LOH status and protein expression (Table 1), an indication that if haploinsufficiency could be effective at the mRNA level, its effect was compensated at the protein level. We can conclude that, in our series of radon-induced rat lung tumors, homozygous deletions, allelic losses, mutations or promoter methylation did not play a recurrent role in the Ink4a gene inactivation.

The inactivation of pRb by Cdk4 overexpression may lead to overexpression of the Ink4a gene [39]. In our series, pRb1 was not expressed in 45% of the tumors, however, Cdk4 was never overexpressed. It must be noticed that the antibody used for pRb detected both phosphorylated and dephosphorylated forms of the protein. Thus some of the expressed proteins could be present in an inactive form, increasing the current percentage of tumors lacking of an active Rb1 pathway. Nevertheless, the protein expression of p16^{Ink4a} and pRb tended to be inversely correlated, as frequently described in lung cancer [9,40]. This could indicate that the Rb1 pathway has a major role in the development of these tumors, through p16^{Ink4a} inactivation, however the exact mechanism remains to be established.

The roles of Arf, the other gene of the Cdkn2a locus, and of the Arf/Mdm2/Mdm4/Tp53 pathway were also investigated. Arf was expressed at a rather high level in all tumors of the series whereas Mdm2 and Mdm4 were never overexpressed, suggesting that, in contrast to primary human lung tumors [41], the deregulation of the Arf/Mdm2/Mdm4 interplay did not play a major role in these radiation-induced rat lung carcinomas. In addition, the low frequency of Tp53 mutation in our series of tumors (14%) indicates that direct inactivation of the tumor suppressor gene is also rarely involved in radon-induced rat lung carcinogenesis. However, it is interesting to note that, as previously shown in humans and rodents [42,43], small deletions are more frequent in radiation-induced tumors than in sporadic tumors and could be a signature of radiation-induced carcinogenesis.

5. Conclusion

In this series of radon-induced rat lung tumors, the Ink4a/Rb1 pathway was characterized by a high recurrence of p16^{Ink4a} lack of expression possibly associated to a pRb downregulation. However, all known mechanisms of inactivation of the pathway do not play a recurrent role in these tumors and the actual origin of the lack of p16^{Ink4a} protein expression remains to be established.

Conflict of interest statement

None.

Acknowledgements

This work was supported in part by the EC RISC-RAD contract: FIGR-CT-2003-508842, AREVA NC and Electricité de France.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.lungcan.2008.06.007.

References

- [1] Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ* 2005;330(7485):223.
- [2] Rogel A, Laurier D, Tirmarche M, Quesne B. Lung cancer risk in the French cohort of uranium miners. *J Radiol Prot* 2002;22(3A):A101–6.
- [3] Monchaux G, Morlier JP, Morin M, Chameaud J, Lafuma J, Masse R. Carcinogenic and cocarcinogenic effects of radon and radon daughters in rats. *Environ Health Perspect* 1994;102(1):64–73.
- [4] Prise KM, Pinto M, Newman HC, Michael BD. A review of studies of ionizing radiation-induced double-strand break clustering. *Radiat Res* 2001;156(5 Pt 2):572–6.
- [5] McDonald JW, Taylor JA, Watson MA, Saccomanno G, Devereux TR. p53 and K-ras in radon-associated lung adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4(7):791–3.
- [6] Belinsky SA. Silencing of genes by promoter hypermethylation: key event in rodent and human lung cancer. *Carcinogenesis* 2005;26(9):1481–7.
- [7] Belinsky SA, Klinge DM, Liechty KC, March TH, Kang T, Gilliland FD, et al. Plutonium targets the p16 gene for inactivation by promoter hypermethylation in human lung adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2004;25(6):1063–7.
- [8] Sharpless NE. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res* 2005;576(1–2):22–38.
- [9] Yokota J, Kohno T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci* 2004;95(3):197–204.
- [10] Ho WL, Chang JW, Tseng RC, Chen JT, Chen CY, Jou YS, et al. Loss of heterozygosity at loci of candidate tumor suppressor genes in microdissected primary non-small cell lung cancer. *Cancer Detect Prev* 2002;26(5):343–9.
- [11] Testa JR, Liu Z, Feder M, Bell DW, Balsara B, Cheng JQ, et al. Advances in the analysis of chromosome alterations in human lung carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;95(1):20–32.
- [12] Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995;1(7):686–92.
- [13] Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(20):11891–6.
- [14] Bearzatto A, Conte D, Frattini M, Zaffaroni N, Andriani F, Balestra D, et al. p16(INK4A) hypermethylation detected by fluorescent methylation-specific PCR in plasmas from non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8(12):3782–7.
- [15] Sanchez-Céspedes M, Reed AL, Buta M, Wu L, Westra WH, Herman JG, et al. Inactivation of the INK4A/ARF locus frequently coexists with TP53 mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1999;18(43):5843–9.
- [16] Hsu HS, Wang YC, Tseng RC, Chang JW, Chen JT, Shih CM, et al. 5' cytosine-phospho-guanine island methylation is responsible for p14ARF inactivation and inversely correlates with p53 overexpression in resected non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(14):4734–41.
- [17] Tam AS, Devereux TR, Patel AC, Foley JF, Maronpot RR, Massey TE. Perturbations of the Ink4a/Arf gene locus in aflatoxin B1-induced mouse lung tumors. *Carcinogenesis* 2003;24(1):121–32.
- [18] Wikenheiser-Brokamp KA. Retinoblastoma regulatory pathway in lung cancer. *Curr Mol Med* 2006;6(7):783–93.

- [19] Dano L, Guilly MN, Muleris M, Morlier JP, Altmeyer S, Vielh P, et al. CGH analysis of radon-induced rat lung tumors indicates similarities with human lung cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;29(1):1–8.
- [20] Monchaux G, Morlier JP, Altmeyer S, Debroche M, Morin M. Influence of exposure rate on lung cancer induction in rats exposed to radon progeny. *Radiat Res* 1999;152(Suppl. 6):S137–40.
- [21] Petitot F, Lebeau J, Dano L, Lectard B, Altmeyer S, Levalois C, et al. In vitro aging of rat lung cells. Downregulation of telomerase activity and continuous decrease of telomere length are not incompatible with malignant transformation. *Exp Cell Res* 2003;286(1):30–9.
- [22] Abe M, Okochi E, Kuramoto T, Kaneda A, Takato T, Sugimura T, et al. Cloning of the 5' upstream region of the rat p16 gene and its role in silencing. *Jpn J Cancer Res* 2002;93(10):1100–6.
- [23] Shaw RJ, Liloglou T, Rogers SN, Brown JS, Vaughan ED, Lowe D, et al. Promoter methylation of P16, RARbeta, E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing. *Br J Cancer* 2006;94(4):561–8.
- [24] Kato A, Shimizu K, Shimoichi Y, Fujii H, Honoki K, Tsujiuchi T. Aberrant DNA methylation of E-cadherin and p16 genes in rat lung adenocarcinomas induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine. *Mol Carcinog* 2006;45(2):106–11.
- [25] Belinsky SA, Swafford DS, Middleton SK, Kennedy CH, Tesfaigzi J. Deletion and differential expression of p16INK4a in mouse lung tumors. *Carcinogenesis* 1997;18(1):115–20.
- [26] Kraunz KS, Nelson HH, Lemos M, Godleski JJ, Wiencke JK, Kelsey KT. Homozygous deletion of p16(INK4a) and tobacco carcinogen exposure in nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 2006;118(6):1364–9.
- [27] Tanaka R, Wang D, Morishita Y, Inadome Y, Minami Y, Iijima T, et al. Loss of function of p16 gene and prognosis of pulmonary adenocarcinoma. *Cancer* 2005;103(3):608–15.
- [28] Herzog CR, Soloff EV, McDoniels AL, Tyson FL, Malkinson AM, Haugen-Strano A, et al. Homozygous codeletion and differential decreased expression of p15INK4b, p16INK4a-alpha and p16INK4a-beta in mouse lung tumor cells. *Oncogene* 1996;13(9):1885–91.
- [29] Swafford DS, Middleton SK, Palmisano WA, Nikula KJ, Tesfaigzi J, Baylin SB, et al. Frequent aberrant methylation of p16INK4a in primary rat lung tumors. *Mol Cell Biol* 1997;17(3):1366–74.
- [30] Kohno T, Yokota J. Molecular processes of chromosome 9p21 deletions causing inactivation of the p16 tumor suppressor gene in human cancer: deduction from structural analysis of breakpoints for deletions. *DNA Repair (Amst)* 2006;5(9–10):1273–81.
- [31] Niklinska W, Chyczewski L, Laudanski J, Chyczewska E, Niklinski J. Detection of p16 abnormalities in early-stage non-small cell lung cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2001;39(Suppl. 2):30–2.
- [32] Gazzeri S, Gouyer V, Vour'ch C, Brambilla C, Brambilla E. Mechanisms of p16INK4A inactivation in non small-cell lung cancers. *Oncogene* 1998;16(4):497–504.
- [33] Sanchez-Céspedes M, Decker PA, Doffek KM, Esteller M, Westra WH, Alawi EA, et al. Increased loss of chromosome 9p21 but not p16 inactivation in primary non-small cell lung cancer from smokers. *Cancer Res* 2001;61(5):2092–6.
- [34] Patel AC, Anna CH, Foley JF, Stockton PS, Tyson FL, Barrett JC, et al. Hypermethylation of the p16 (INK4a) promoter in B6C3F1 mouse primary lung adenocarcinomas and mouse lung cell lines. *Carcinogenesis* 2000;21(9):1691–700.
- [35] McDoniels-Silvers AL, Herzog CR, Tyson FL, Malkinson AM, You M. Inactivation of both Rb and p53 pathways in mouse lung epithelial cell lines. *Exp Lung Res* 2001;27(3):297–318.
- [36] Nakata S, Sugio K, Uramoto H, Oyama T, Hanagiri T, Morita M, et al. The methylation status and protein expression of CDH1, p16(INK4A), and fragile histidine triad in nonsmall cell lung carcinoma: epigenetic silencing, clinical features, and prognostic significance. *Cancer* 2006;106(10):2190–9.
- [37] Honoki K, Tsujiuchi T, Mori T, Yoshitani K, Tsutsumi M, Takakura Y, et al. Expression of the p16INK4a gene and methylation pattern of CpG sites in the promoter region in rat tumor cell lines. *Mol Carcinog* 2004;39(1):10–4.
- [38] Smilenov LB. Tumor development: haploinsufficiency and local network assembly. *Cancer Lett* 2006;240(1):17–28.
- [39] Kaye FJ. RB and cyclin dependent kinase pathways: defining a distinction between RB and p16 loss in lung cancer. *Oncogene* 2002;21(45):6908–14.
- [40] Wikman H, Kettunen E. Regulation of the G1/S phase of the cell cycle and alterations in the RB pathway in human lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006;6(4):515–30.
- [41] Eymin B, Gazzeri S, Brambilla C, Brambilla E. Mdm2 overexpression and p14(ARF) inactivation are two mutually exclusive events in primary human lung tumors. *Oncogene* 2002;21(17):2750–61.
- [42] Gonin-Laurent N, Gibaud A, Huygue M, Lefevre SH, Le Bras M, Chauveinc L, et al. Specific TP53 mutation pattern in radiation-induced sarcomas. *Carcinogenesis* 2006;27(6):1266–72.
- [43] Ootsuyama A, Makino H, Nagao M, Ochiai A, Yamauchi Y, Tanooka H. Frequent p53 mutation in mouse tumors induced by repeated beta-irradiation. *Mol Carcinog* 1994;11(4):236–42.

Tables and figures, supplementary data.

Table SI Primer list.

Reaction	Gene	Sequence (5' -> 3')	Annealing temperature	MgCl ₂ Final concentration (mM)
Expression	p16Ink4a ^a	AACACTTTCGGTCGTACCC ^b GTCCTCGCAGTTCGAATC ^b	61°C	3
	p19ARF	CAGGAGCATGGGTCGCAGGT ^c GGTCGGGAGAGGGTGGTGGG ^c	65°C	2
	Cdk4	GCCTGTGGTTGTTACGCTCT ^d AGGCAATCCAATGAGACTAAAG ^d	60°C	4
	Mdm2	AGTGATGAAGGGCATGAGCTCT ^e TGTTGCAGTGTGATGGAAGGG ^e	60°C	5
Sequencing	p16Ink4a Exon 1	TGGTCACACCACTGGCGA ^f TGCAGATGGGACATTCTG ^g	59°C	1.7
	p16Ink4a Exon 2	GCAACGTCAAAGTGGCAG ^g CGTGGAAGATCTCCACCTCAGAC ^g	61°C	1.7
	p16Ink4a Exon 2 cDNA	CAAACGCCCGAACACTT T ^b GCTTGAGCAGAAGTTATGCCTGT ^b	64°C	5.7
	p16Ink4a Exon 3 cDNA	CGTGCGGTATTTGCGGTATCT ^b GCGTTGCCAGAAGTGAAGCC ^b	61°C	4
	Tp53 cDNA	TCTGCTGGGATTGGGACTTT ^h CCAGCAACTACCAACCCATT ^h	58°C	.*
	Tp53 cDNA nested 1	TTCCCCCTCCCACGTGCT ^h TGTTGTGACTTCTTGTAGATGGC ^h	60°C	.*
	Tp53 cDNA nested 2	CTCCACACCTCCACCTGGTA ^h TTGTCAGCTCTCATAACAAGCCC ^h	62°C	.*
Methylation study	p16Ink4a Sequence 1	TTTGTGGGAGGAGGAGAGA ^f ACAAAAAAAAATAAAAAATTCCTATAA ^f	53°C	3
	p16Ink4a Sequence 2	TGGGGTGGGTAGTAGTGTTTTA ^f ACCAATAAAACCCTCCTTCCTTC ^f	58°C	1.5
	p16Ink4a Sequence 3	GGAAGGAGGGTTTATTGGTTA ^f AATCTATCTACAAAAAATCCATACT ^f	58°C	3
Homozygous deletion	p16Ink4a Exon 1	TCACACCACTGGCGACTG ^f GCTGCCCTGGCTAGTCTATC ^g	56°C	.*
	p16Ink4a Exon 2	GTCGTGCGGTATTTGCGGT ^g GCTCACCTGGGCGTGCTT ^g	60°C	.*
	p16Ink4a Exon 3	CAAAGCAGCGCTAAGTTAGG ^g GCCATATGCTAGTCTCGCGTT ^g	60°C	.*
	Gusb	TGTCTCTTCGGCACCACT ⁱ GACCACATCACGACCGCA ⁱ	58°C	.*

a: primers published by Abe and al. [22], b: sequence RNA NM_031550 of Ink4a, c: sequence RNA AF474974 of Arf, d: sequence RNA NM_053593 of Cdk4, e: sequence RNA XM_235169 of Mdm2, f: sequence DNA AB081658 of Ink4a promoter, g: sequence DNA NC_005104 of Ink4a, h: sequence RNA NM_030989 of Tp53, i: sequence DNA NC_005111 of Gusb, *MgCl₂ conditions of the kit (see materials and methods).

Table SII Homozygous deletion of the Ink4a gene.

Case	Exon 1 α	Exon 2	Exon 3	Conclusion
1	1.0	1.6	0.3	-
2	0.6	0.3	0.3	-
3	0.7	0.2	0	-
4	0.4	0.1	-0.6	-
5	-0.2	-0.2	-0.5	-
6	1.2	0.5	0.5	-
7	1	0.1	0.8	-
8	-0.1	0	0.6	-
9	2.1	1.8	1.8	-
10	0.8	0.7	1.1	-
11	2.4	1.6	1.8	-
12	0.6	0	0.4	-
13	1.2	0.7	0.5	-
14	4	2.5	4	HD
15	2.2	2	2.2	-
16	4	3.8	3.8	HD
17	1.3	1.3	1.2	-
18	2.1	2.4	1.9	-
19	2.4	2.4	2.5	-
20	-0.9	-0.4	0.4	-
21	0.1	-0.8	-0.3	-
22	0.8	-0.6	0.6	-
23	0.3	1.1	0.4	-
24	0.7	-2.2	-1.7	-
25	0.6	0.3	0.3	-
26	0.1	-1	0	-
27	2.3	1.2	1.4	-
28	2.2	0.4	1.5	-
29	0.7	0.8	0.6	-
30	0.5	-1.5	-0.4	-
31	-0.5	-0.3	-0.2	-
32	0.3	-0.1	0.3	-
33	-0.6	-0.3	0.3	-

Homozygous deletion (HD) in the three exons of Ink4a was sought by quantitative PCR. $\Delta\Delta C_t$ were obtained after calibration with the Gusb gene and normalization using normal cell DNA. Ratios higher than 3.5 correspond to HD.

Table SIII Methylation of the Ink4a promoter.

Case	Promoter															Exon 1α					Mtl
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1																					0.2
2																					0.11
3																					0.07
4																					0.05
5	na																				na
6																					0.34
7																					0.33
8																					0.29
9																					0.2
10																					0.17
11																					0.08
12																					0.07
13																					0.05
14	nd																				nd
15																					0.05
16	nd																				nd
17																					0.05
18																					0.05
19																					0.04
20																					0.42
21																					0.22
22																					0.15
23																					0.12
24																					0.09
25																					0.08
26																					0.08
27																					0.06
28	na																				na
29																					0.57
30																					0.45
31																					0.24
32																					0.55
33																					0.27
L1																					0.05
L2																					0.05
R1																					0.84
R2																					0.86

Percentage of methylation of the CpG: empty circle lower than 5%, hatched circle between 5% and 20%, full grey circle between 20% and 50% and full black circle higher than 50%, na: not available; nd: not done; Mtl: methylation index; L1, L2: control lung tissues; R1, R2: rat lung epithelial cell lines. Methylation of the Ink4a promoter was analyzed by pyrosequencing.

Chapitre III

Caractérisation des tumeurs mixtes ASq radon-induites chez le rat
par analyse transcriptomique comparative.

Chapitre III

Caractérisation des tumeurs mixtes ASq radon-induites chez le rat par analyse transcriptomique comparative.

Introduction

Trois types histologiques de tumeurs pulmonaires ont été obtenus chez le rat après inhalation de radon : les AC, les Sq et les ASq. Ces tumeurs sont histologiquement similaires aux tumeurs pulmonaires humaines appartenant à la classe des CBNPC. La fréquence des ASq chez l'homme est moins élevée que celle des AC et des Sq. Ces tumeurs mixtes contiennent une composante AC et une composante Sq et se caractérisent, sur le plan clinique, par une plus grande agressivité que les tumeurs AC et Sq « simples » [269]. L'histologie des deux composantes est bien définie, les cellules glandulaires AC formant des structures tubulaires ou papillaires et les cellules épithéliales Sq pouvant être plus ou moins différenciées avec ou sans kératine. Une étude moléculaire a été menée sur 12 ASq, qui met en évidence des similarités génétiques entre les deux composantes AC et Sq, suggérant une même origine clonale pour les deux types cellulaires [97]. Cependant, à notre connaissance, il n'existe aucune analyse moléculaire des ASq dans leur globalité.

Afin d'approfondir la caractérisation moléculaire des ASq et de déterminer si ces tumeurs mixtes correspondent effectivement à un mélange de cellules AC et Sq ou si elles présentent leurs propres spécificités moléculaires, nous avons réalisé une analyse transcriptomique comparative des trois types de tumeurs pulmonaires radon-induites obtenus chez le rat.

Résultats

Une analyse transcriptomique par hybridation sur puces à ADN a été menée pour 9 ASq, 5 AC et 5 Sq. L'hybridation de chaque tumeur contre un échantillon de référence a été effectuée sur des puces oligonucléotides de rat selon les conditions décrites en annexe 3. Nous avons recherché l'existence de signatures distinguant respectivement les AC des Sq, les AC des ASq et les ASq des Sq. La méthode d'analyse est présentée en annexe 3. Trois signatures ont été trouvées (figure 14) : au total, 72 gènes permettent de différencier les AC des Sq, 40 gènes composent la signature ASq/Sq et 39 gènes permettent de distinguer les AC des ASq.

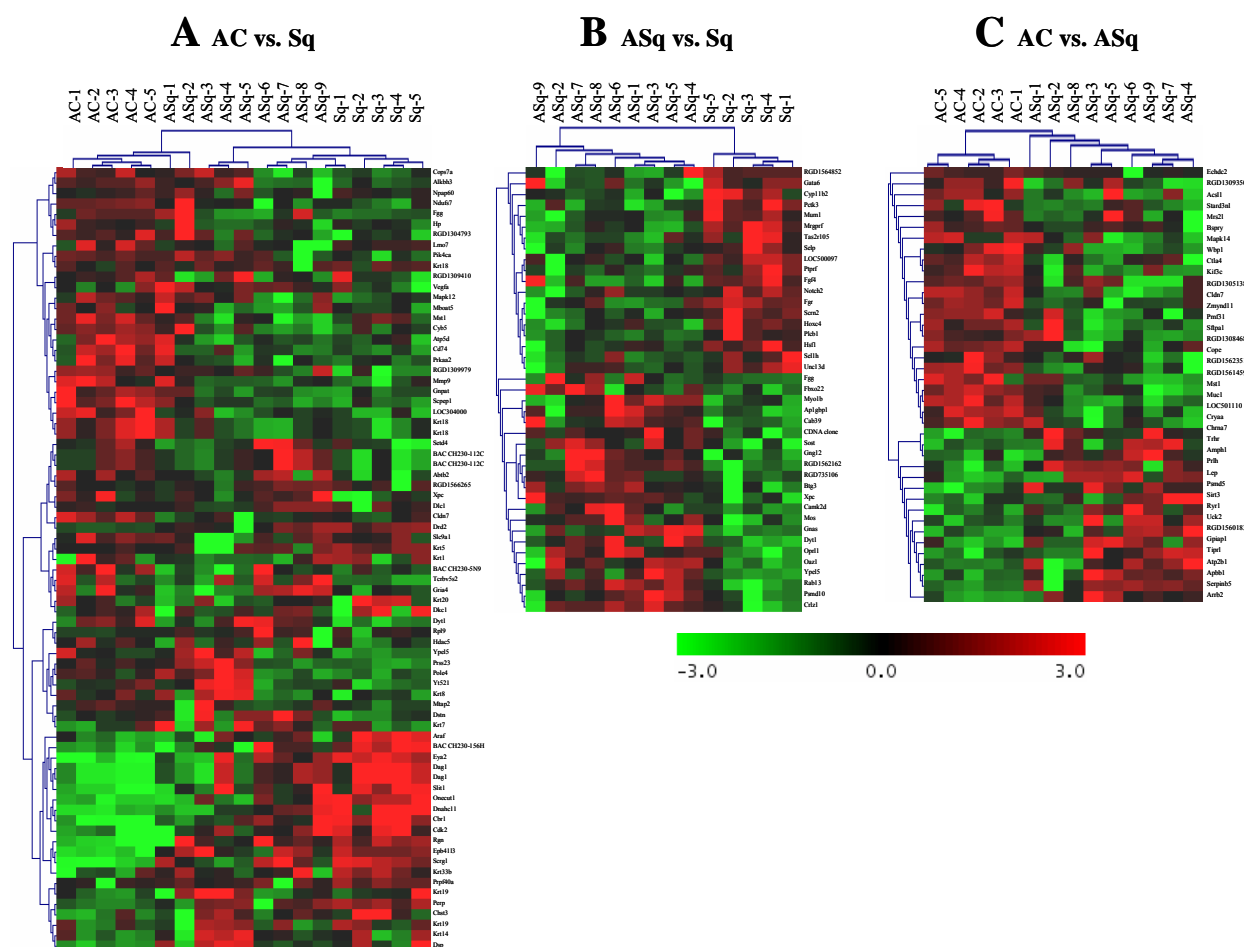


Figure 14 Représentation par classification hiérarchique des gènes exprimés de manière différentielle entre les trois types de tumeurs pulmonaires radon-induites chez le rat. **A** : signature permettant de différencier les AC et les Sq ; **B** : signature discriminant les ASq des Sq ; **C** : signature AC/ASq. Le dendrogramme supérieur représente le classement des tumeurs. Les gènes de la signature AC/Sq ont servi au classement des ASq au sein des AC et des Sq (A).

Parmi les gènes de la signature AC/Sq, listés dans le tableau 3A, 52 gènes sont plus exprimés dans les AC que dans les Sq tandis que 20 autres gènes suivent le profil inverse. Afin de définir le comportement des tumeurs mixtes par rapport aux tumeurs « simples » AC et Sq, nous avons utilisé le profil des gènes de la signature AC/Sq pour classer les ASq avec les AC et les Sq (figure 14A). Nous observons que les ASq prennent une position centrale dans le dendrogramme, avec des tumeurs plus proches des AC (ASq1 et 2) et d'autres plus proches des Sq (ASq 9). La signature ASq/Sq se compose de 21 gènes sur-exprimés et de 19 gènes

sous-exprimés dans les ASq par rapport aux Sq (tableau 3B). Les ASq peuvent par ailleurs se différencier des AC par un ensemble de 16 gènes sur-exprimés et 23 gènes sous-exprimés (tableau 3C).

Comme indiqué dans le tableau 4, l'expression différentielle de certains gènes sélectionnés arbitrairement a été validée par PCR quantitative, renforçant la robustesse des signatures.

Gène	AC	ASq	Sq	P-Value
Muc1	45.873	7.039	-	0,008
Prlh	12.905	14.805	-	0,021
Kif3c	0.109	0.094	-	0,026
Sftpa1	3,467	0,494	-	0,007
Mmp9	109.554	-	58.565	0,013
Araf1	5.068	-	6.129	0,030
Prkaa2	0.157	-	0.010	0,005
Rab13	-	0.976	0.712	0,030
Fgr	-	2.411	3.987	0,025

Tableau 4 PCR quantitative : moyenne de l'expression des gènes dans chaque groupe de tumeurs. Les données d'expression sont normalisées par rapport à l'expression du gène de ménage Gusb. Les données statistiques (valeurs de p) sont obtenues par le test T de Student.

Tableau 3A Gènes exprimés de manière différentielle entre les AC et les Sq

Symbole	Numéro d'accès ^a	Nom	Fonction ^b	Profil d'expression ^c
Cancer/Prolifération/Métastase				
Vegfa	NM_031836	Vascular endothelial growth factor A	Angiogenèse	HL
Prkaa2	NM_023991	Protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit	Contrôle énergétique, stabilisation VEGF	HL
Hp	NM_012582	Haptoglobin	Catabolisme de l'hémoglobine, angiogenèse	HL
Fgg	NM_012559	Fibrinogen, gamma polypeptide	Coagulation, adhésion cellulaire	HL
Lmo7	NM_001001515	LIM domain only protein 7	Adhésion cellulaire	HL
Dag1	AF357216	Dystroglycan 1	Adhésion cellulaire	LH
Epb4113	NM_053927	Erythrocyte protein band 4.1-like 3	Adhésion cellulaire	LH
Cldn7	AJ011811	Claudin 7	Adhésion cellulaire	HL
Dstn	XM_215862	Similar to destrin	Dépolymérisation de l'actine	HL
Dlc1	D31962	Deleted in liver cancer 1	Réorganisation du cytosquelette	HL
Mmp9	NM_031055	Matrix metalloproteinase 9	Dégradation de la matrice extra-cellulaire	HL
Slc9a1	NM_012652	Solute carrier family 9, member 1	Régulation du pH cellulaire, métastase	HL
Perp	XM_214953	PERP, TP53 apoptosis effector	Activateur de l'apoptose	LH
Cdk2	D28753	Cyclin dependent kinase 2	Régulation du cycle cellulaire	LH
Araf	NM_022532	V-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog	Transduction du signal mitogène	LH
Mapk12	NM_021746	Mitogen-activated protein kinase 12	Inhibition du cycle cellulaire	HL
Xpc	XM_232194	Xeroderma pigmentosum, complementation group C	Réparation de l'ADN	HL
Ypel5	NM_001035221	Yippee-like 5	Division cellulaire	HL
Différenciation épithéliale/neuroendocrine				
Dsp	XM_225259	Desmoplakin	Adhésion cellulaire	LH
Krt19	X81449	Keratin 19	Différenciation épithéliale	LH
Krt19	AF089866	Keratin 19	Différenciation épithéliale	LH
Krt14	D63774	Keratin 14	Différenciation épithéliale	LH
Krt33b	AB013294	Keratin 33B	Différenciation épithéliale	LH
Krt7	XM_217035	Keratin 7	Différenciation épithéliale	HL
Krt8	M63482	Keratin 8	Différenciation épithéliale	HL
Krt20	M63665	Keratin 20	Différenciation épithéliale	LH
Krt5	M93638	Keratin 5	Différenciation épithéliale	LH
Krt1	X54806	Keratin 1	Différenciation épithéliale	HL
Krt18	U67992	Keratin 18	Différenciation épithéliale	HL
Krt18	X81448	Keratin 18	Différenciation épithéliale	HL
Mtap2	NM_013066	Microtubule-associated protein 2	Neurogenèse, assemblage des microtubules	HL
Mst1	NM_024352	Macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)	Régulation neuroendocrine	HL
Slit1	NM_022953	Slit homolog 1	Développement neuronal	LH
Scrg1	NM_033499	Scrapie responsive gene 1	Réponse immunitaire neuronale	LH
Gria4	NM_017263	Glutamate receptor, ionotropic, 4	Transmission synaptique	HL
Drd2	NM_012547	Dopamine receptor 2	Transduction du signal neuroendocrine	LH
Divers				
Pik4ca	U39572	Phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, alpha polypeptide	Transduction du signal	HL
Pole4	XM_342710	Polymerase (DNA-directed), epsilon 4 (p12 subunit)	Réplication de l'ADN	HL
Alkbh3	NM_001014180	AlkB, alkylation repair homolog 3	Déméthylation de l'ADN	HL
Onecut1	Y14933	One cut domain, family member 1	Activateur de la transcription	LH
Eya2	AB073099	Eyes absent 2 homolog	Activateur de la transcription	LH
Hdac5	AY038024	Histone deacetylase 5	Répression de la transcription	HL
Yt521	D78303	Splicing factor YT521-B	Epissage des ARNm	HL
Prp40a	XM_215739	Pre-mRNA processing factor 40 homolog A	Epissage des pré-ARNm	LH
Dkc1	Z34922	Dyskeratosis congenita 1, dyskerin	Maintenance des ARNr et des télomères	HL
Rpl9	NM_001007598	Ribosomal protein L9	Synthèse protéique	HL
Dyt1	NM_153303	Dystonia 1	Conformation protéique	HL
Npap60	NM_012991	Nuclear pore associated protein	Transport des protéines nucléaires	HL
Cops7a	XM_232351	COP9 homolog, subunit 7a	Dégradation protéique	HL
Scsep1	AF330051	Serine carboxypeptidase 1	Protéolyse	HL
Prss23	NM_001007691	Protease, serine, 23	Protéase ovarienne	HL
Dnahc11	U61743	Beta heavy chain of outer-arm axonemal dynein ATPase	Mouvements cellulaires	LH
Abtb2	AB000216	Ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2	Régulation de la croissance cellulaire	HL
LOC304000	NM_001006990	Cell adhesion molecule JCAM	Adhésion cellulaire	HL
Nduf57	NM_001008525	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7	Chaîne respiratoire mitochondriale	HL
Cyb5	NM_022245	Cytochrome b-5	Transporteur mitochondrial d'électrons	HL
Atp5d	NM_139106	ATP synthase, mitochondrial F1 complex, delta subunit	Biosynthèse d'ATP	HL
Cbr1	NM_019170	Carbonyl reductase 1	Métabolisme énergétique	LH
Rgn	NM_031546	Regucalcin	Equilibre calcique	LH
Chst3	NM_053408	Carbohydrate (chondroitin 6/keratan) sulfotransferase 3	Métabolisme de la chondroïtine sulfate	LH
Gnpat	NM_053410	Glyceronephosphate O-acyltransferase	Synthèse lipidique	HL
Mboat5	NM_001012189	Membrane bound O-acyltransferase domain containing 5	Régulation lipidique	HL
Cd74	X14254	CD74 antigen	Réponse immunitaire	HL
Terbv5s2	AF044280	Similar to T-cell receptor beta chain V region C5 precursor	Réponse immunitaire	HL
Fonction inconnue				
RGD1304793	XM_232731	Similar to hypothetical protein DKFZp564D0478	Inconnue	HL
RGD1309410	XM_347094	LOC363020 (predicted)	Inconnue	HL
RGD1309979	XM_215848	Similar to chromosome 20 open reading frame 116	Inconnue	HL
Setd4	XM_340970	SET domain containing 4	Inconnue	HL
BAC CH230-112C2	AC106374	Rattus norvegicus 4 BAC CH230-112C2	Inconnue	HL
RGD1566265	XM_343810	Similar to RIKEN cDNA 2610002M06	Inconnue	HL
BAC CH230-5N9	AC114512	Rattus norvegicus 5 BAC CH230-5N9	Inconnue	HL
BAC CH230-156H17	AC136645	Rattus norvegicus 7 BAC CH230-156H17	Inconnue	LH

^aNuméro d'accès GenBank^bLa fonction des gènes est déterminée à partir de la littérature et des données Entrez Gene d'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>)^cHL : pour High/Low lorsque l'expression du gène est supérieure dans les AC et inférieure dans les Sq, LH : pour Low/High lorsque le profil est inversé

Tableau 3B Gènes exprimés de manière différentielle entre les ASq et les Sq

Symbole	Numéro d'accès ^a	Nom	Fonction ^b	Profil d'expression ^c
Cancer/Prolifération/Métastase				
Fgr	NM_024145	Gardner-Rasheed sarcoma viral (Fgr) oncogene homolog	Migration cellulaire	LH
Fgg	NM_012559	Fibrinogen, gamma polypeptide	Coagulation, adhésion cellulaire	HL
Rab13	M83678	RAB13, member RAS oncogene family	Polarité épithéliale, jonctions serrées	HL
Selp	NM_013114	Selectin, platelet	Adhésion aux cellules endothéliales	LH
Psm10	NM_053925	Proteasome 26S subunit, non-ATPase, 10	Composant du protéasome, inhibition de p53	HL
Btg3	NM_019290	B-cell translocation gene 3	Facteur de transcription, activation de p53	HL
Oaz1	NM_139081	Ornithine decarboxylase antizyme 1	Métabolisme des polyamines, synthèse d'ADN	HL
Camk2d	S69671	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	Voie du calcium, synthèse d'ADN	HL
Pctk3	AB005541	PCTAIRE-motif protein kinase 3	Régulateur du cycle cellulaire	LH
Sell1h	AF304855	Sell (suppressor of lin-12) 1 homolog	Croissance cellulaire	LH
Hsf1	X83094	Heat shock transcription factor 1	Transcription des protéines HSP, mitose	LH
Plcb1	M20636	Phospholipase C, beta 1	Transduction du signal, prolifération	LH
Fgf4	AF260830	Fibroblast growth factor 4	Facteur de croissance	HL
Mos	NM_020102	V-mos moloney murine sarcoma viral oncogene homolog	Facteur cytotatique, voie ERK	HL
Gnas	NM_019132	GNAS complex locus	Transduction du signal, voie ERK	HL
Gng12	AF022091	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12	Transduction du signal, voie ERK	HL
Ptprf	NM_019249	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	Adhésion cellulaire	LH
Xpc	XM_232194	Xeroderma pigmentosum, complementation group C	Réparation de l'ADN	HL
Ypel5	NM_001035221	Yippee-like 5	Division cellulaire	HL
Divers				
Notch2	NM_024358	Notch gene homolog 2	Développement neuroendocrine	LH
Cyp11b2	NM_012538	Cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2	Synthèse des hormones stéroïdiennes	LH
Gata6	NM_019185	GATA binding protein 6	Différenciation épithéliales	LH
Hoxc4	M37567	Homeo box C4	Différenciation des kératinocytes	LH
Mrgprf	M35297	MAS-related GPR, member F	Transduction du signal	LH
Oprl1	NM_031569	Opioid receptor-like 1	Transduction du signal	HL
Tas2r105	NM_023999	Taste receptor, type 2, member 105	Récepteur sensoriel	LH
Dyt1	NM_153303	Dystonia 1	Conformation protéique	HL
Ap1gbp1	AF169549	AP1 gamma subunit binding protein 1	Transport protéique	HL
Myo1b	NM_053986	Myosin Ib	Transport vésiculaire	HL
Unc13d	AF159356	Unc-13 homolog D	Exocytose	LH
Sern2	NM_001012142	Secernin 2	Exocytose	LH
Fbxo22	NM_001037770	F-box only protein 22	Ubiquitination	HL
Cab39	XM_217464	Calcium binding protein 39	Régulateur de la polarité cellulaire	HL
Sost	NM_030584	Sclerostin	Ossification	HL
Fonction inconnue				
Crzl1	NM_001012036	Charged amino acid rich leucine zipper 1	Inconnue	HL
Mum1	NM_001108736	Melanoma associated antigen (mutated) 1	Inconnue	LH
RGD1564852	XM_228973	Similar to hypothetical protein FLJ14503	Inconnue	LH
LOC500097	AF213506	Similar to T-cell receptor beta chain V region C5 precursor	Inconnue	LH
CDNA clone	BC086519	CDNA clone IMAGE:7302535	Inconnue	HL
RGD735106	NM_198766	Similar to RIKEN cDNA 0610011N22 gene	Inconnue	HL

^aNuméro d'accès GenBank^bLa fonction des gènes est déterminée à partir de la littérature et des données Entrez Gene d'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>)^cHL : pour High/Low lorsque l'expression du gène est supérieure dans les ASq et inférieure dans les Sq, LH : pour Low/High lorsque le profil est inversé.

Tableau 3C Gènes exprimés de manière différentielle entre les AC et les ASq

<i>Symbole</i>	<i>Numéro d'accès^a</i>	<i>Nom</i>	<i>Fonction^b</i>	<i>Profil d'expression^c</i>
Cancer/Prolifération/Métastase				
Serpinb5	NM_057108	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, memb 5	Mobilité cellulaire	LH
Cldn7	AJ011811	Claudin 7	Adhésion cellulaire	HL
Mapk14	NM_031020	Mitogen activated protein kinase 14	Transduction du signal mitogène	HL
Kif3c	NM_053486	Kinesin family member 3C	Division cellulaire	HL
Uck2	AB030700	Uridine-cytidine kinase 2	Synthèse d'ADN	LH
Différenciation épithéliale/neuroendocrine				
Muc1	AF007554	Mucin 1, transmembrane	Sécrétion glandulaire	HL
Sftpa1	NM_017329	Surfactant, pulmonary-associated protein A1	Sécrétion alvéolaire	HL
Mst1	NM_024352	Macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)	Régulation neuroendocrine	HL
Amph1	NM_022217	Amphiphysin 1	Transmission synaptique	LH
Chrna7	NM_012832	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7	Transmission synaptique	LH
Divers				
Arb2	NM_012911	Arrestin, beta 2	Transduction du signal	LH
Bspry	NM_022261	B-box and SPRY domain containing	Transduction du signal	HL
Tipr1	XM_341145	TIP41, TOR signalling pathway regulator-like	Transduction du signal	LH
Gpiap1	NM_001012185	GPI-anchored membrane protein 1	Activateur de la transcription	LH
Apbb1	NM_080478	Amyloid beta precursor protein-binding, family B, memb 1	Régulateur de la transcription	LH
Zmynd11	BC065308	Zinc finger, MYND domain containing 11	Répresseur de la transcription	HL
Cope	XM_214309	Coatomer protein complex, subunit epsilon	Transport protéique	HL
Psmc5	XM_216041	Proteasome 26S subunit, non-ATPase, 5	Dégradation protéique	LH
Sirt3	XM_215124	Sirtuin 3	Déacétylation protéique	LH
Wbp1	XM_216198	WW domain binding protein 1	Interaction protéique	HL
LOC501110	NM_001024361	Similar to Glutathione S-transferase A1	Détoxification	HL
Mrs2l	NM_024001	MRS2-like, magnesium homeostasis factor	Transport du magnésium	HL
Atp2b1	NM_053311	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 1	Transport du calcium	LH
Ryr1	AF112256	Ryanodine receptor 1, skeletal muscle	Transport du calcium	LH
Trhr	NM_013047	Thyrotropin releasing hormone receptor	Régulateur de la fonction thyroïdienne	LH
RGD1309350	XM_215112	Similar to transthyretin (4L369)	Transport des hormones thyroïdiennes	HL
Stard3nl	NM_001008298	STARD3 N-terminal like	Transport cholestérol	HL
Echdc2	XM_216479	Enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 2	Métabolisme des acides gras	HL
Acs1l	D90109	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	Métabolisme des acides gras	HL
Lep	NM_013076	Leptin	Catabolisme des acides gras	LH
Prlh	NM_022222	Prolactin releasing hormone	Activité hormonale	LH
Cryaa	NM_012534	Crystallin, alpha A	Protéine du cristallin	HL
Ctla4	NM_031674	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	Réponse immune	HL
Fonction inconnue				
Pmf31	AB020504	PMF32 protein	Inconnue	HL
RGD1305138	XM_235689	Similar to expressed sequence AW556797	Inconnue	HL
RGD1308468	XM_227253	similar to expressed sequence C87860	Inconnue	HL
RGD1560183	XM_224552	Similar to hypothetical protein FLJ14624	Inconnue	LH
RGD1562351	XM_575345	Similar to chromosome 7 open reading frame 23	Inconnue	HL
RGD1561459	XM_341884	Similar to RIKEN cDNA 1810020D17	Inconnue	HL

^aNuméro d'accès GenBank^bLa fonction des gènes est déterminée à partir de la littérature et des données Entrez Gene d'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>)^cHL : pour High/Low lorsque l'expression du gène est supérieure dans les AC et inférieure dans les Sq, LH : pour Low/High lorsque le profil est inversé.

Discussion

L'objectif de l'analyse transcriptomique comparative de 9 ASq au regard de 5 AC et de 5 Sq est de déterminer si ces tumeurs mixtes, qui se définissent sur le plan histologique comme un mélange de composantes cellulaires AC et Sq, répondent à cette définition de mélange sur le plan moléculaire ou si elles présentent des caractéristiques propres. Il est important de rappeler que les critères anatomopathologiques imposent que chaque contingent glandulaire et épithélial représente au minimum 10 % de la masse tumorale [77]. Ces tumeurs peuvent donc présenter de fortes variations dans les proportions de chacune des composantes, formant ainsi un groupe hétérogène.

Afin de définir si ces tumeurs portent une empreinte transcriptomique du mélange AC et Sq, nous avons recherché comment se placent des ASq introduits dans le classement de tumeurs « pures » AC et Sq. La première étape de notre travail a donc consisté à trouver une signature AC/Sq et à la confronter aux données de la littérature relatives aux tumeurs pulmonaires humaines de mêmes types histologiques. La comparaison des profils transcriptomiques des AC et des Sq pulmonaires chez l'homme a fait l'objet de quelques publications [244, 248, 249, 270-272] et plusieurs des gènes discriminants les deux types de tumeurs sont retrouvés dans la signature AC/Sq obtenue ici chez le rat. C'est le cas du gène suppresseur de tumeur Dlc1 (Deleted in liver cancer 1), du gène Lmo7, associé à l'actinine dans l'adhésion cellulaire, et de la desmoplakine (Dsp), composant du desmosome. Egalement en accord avec la littérature, de nombreux gènes codant pour des kératines apparaissent dans cette signature AC/Sq de rat : les kératines 1, 7, 8 et 18 sont plus fortement exprimées dans les AC [273-275], et les kératines 5, 14, 19 et 20 sont sur-exprimées dans les Sq [274-278]. Ces données renforcent la pertinence de nos signatures et confirment que les AC et les Sq se distinguent par différents marqueurs de la différenciation épithéliale. Il est également intéressant de noter que plusieurs gènes impliqués dans la dissémination métastatique, dans la prolifération et dans l'angiogenèse sont exprimés de manière différentielle entre les AC et les Sq de rat. Il s'agit du facteur de croissance Vegfa, de la cycline CDK2, de la claudine 7 (Cldn7), de la métalloprotéinase Mmp9, du fibrinogène (Fgg) et de l'haptoglobine (Hp). Tous ces gènes ont été préalablement décrits comme permettant de différencier les deux types de tumeurs chez l'homme [279-284]. Le gène Epb41l3 (ou Dal-1 pour Differentially expressed in Adenocarcinoma of the Lung-1), suppresseur de métastase dans les CBNPC [285], est, quant à lui, sous-exprimé dans les AC murins. Il a été montré que cette diminution d'expression dans les AC était liée à la méthylation du promoteur du gène [286]. L'ensemble

des variations d'expression de ces gènes vont dans le sens d'un pouvoir métastatique plus marqué dans les AC que dans les Sq, comme décrit précédemment chez l'homme [287]. Après avoir établi que cette signature était valide pour classer les tumeurs AC et Sq et qu'elle était cohérente avec les données de la littérature, nous avons testé comment se classaient les tumeurs mixtes ASq dans cette signature. De manière très intéressante, les tumeurs ASq se positionnent entre les deux types de tumeurs « pures », plus ou moins proches d'un des deux groupes (figure 14A), probablement en fonction du pourcentage de chacune des composantes dans les différentes tumeurs. Ainsi, cette analyse nous montre clairement que, en se basant sur l'expression des gènes de la signature AC/Sq, les tumeurs mixtes ASq se comportent comme de « vrais » mélanges AC et Sq, les deux composantes étant représentées en proportions variables d'une ASq à une autre.

Dans un deuxième temps, nous avons recherché si les tumeurs mixtes présentaient des spécificités moléculaires par rapport aux AC, et par rapport aux Sq, en recherchant s'il existait des signatures AC/ASq et ASq/Sq. Ces deux signatures ont été trouvées et analysées (figures 14B et 14C). Elles ne présentent aucun gène commun, indiquant que les tumeurs ASq ont des spécificités moléculaires par rapport aux AC d'une part, et aux Sq d'autre part, mais qu'elles n'ont pas de spécificité moléculaire par rapport au groupe de tumeurs AC + Sq. Par ailleurs, les signatures AC/ASq et ASq/Sq présentent respectivement 2 et 4 gènes communs avec la signature AC/Sq, soulignant que ces nouveaux profils transcriptomiques correspondent bien à des gènes dont l'expression est spécifique des tumeurs mixtes. A notre connaissance, cette analyse transcriptomique des ASq mettant en évidence leur spécificité moléculaire, est unique.

Comparés aux Sq, les ASq expriment plus faiblement les gènes *Gata6* et *Hoxc4* impliqués dans la différenciation de l'épithélium respiratoire et des kératinocytes [288, 289], données en accord avec une composante épithéliale squameuse moins représentée dans les ASq que dans les Sq. Le gène *Notch2*, associé aux cellules pulmonaires non-neuroendocrines, induit la répression transcriptionnelle des gènes de la différenciation neuroendocrine [290]. Sa sous-expression dans les ASq par rapport aux Sq indique que ces tumeurs mixtes pourraient appartenir à la minorité des CBNPC qui présentent un profil de différenciation neuroendocrine [291]. La signature ASq/Sq contient également plusieurs gènes de la voie des MAPK, sur-exprimés dans les ASq (figure 15) : le facteur de croissance *Fgf4*, les protéines *Gng12* et *Gnas* et la *MAPKKK Mos*, qui conduisent à l'activation de ERK. De manière concordante, le gène codant pour la phosphatase *Ptprf*, qui inhibe la transduction du signal

entre Fgfr et Grb2 par phosphorylation, est sous-exprimé dans les ASq. La cascade des MAPK active la prolifération cellulaire et peut jouer un rôle dans la transformation maligne et la carcinogenèse pulmonaire [292]. L'activation des voies JNK, p38MAPK et ERK a précédemment été observée dans les CBNPC [293-295]. L'expression des gènes de la signature montre ici que l'activation de la voie ERK pourrait être impliquée préférentiellement dans les ASq par rapport aux Sq.

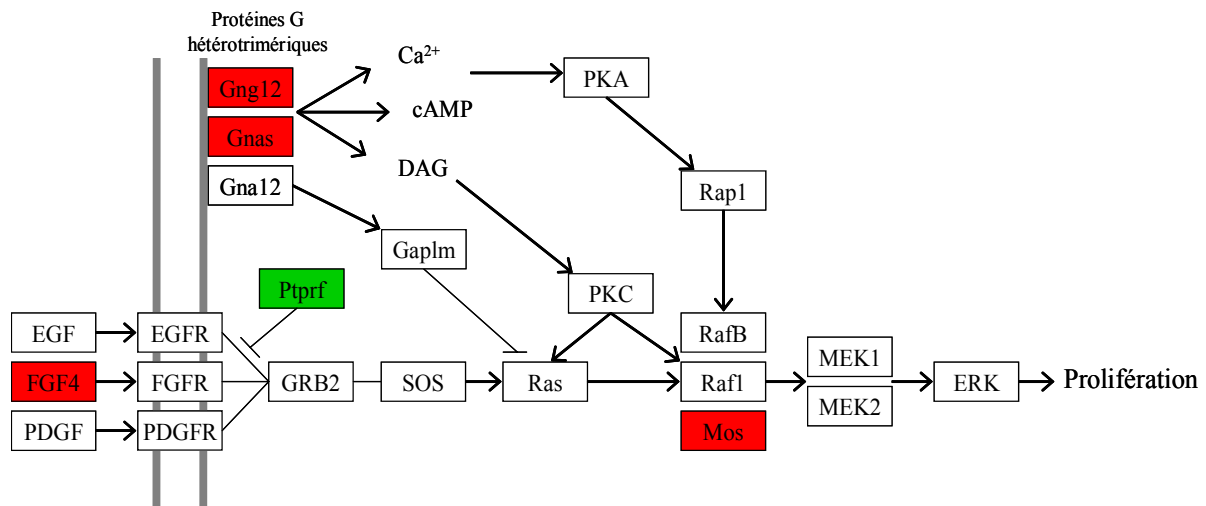


Figure 15 Régulation de la voie ERK. En rouge, les gènes sur-exprimés dans les ASq par rapport aux Sq, en vert, le gène sous-exprimé.

La sur-expression protéique de l'oncogène MOS et la mutation du gène BRAF (ou RafB) ont plus précisément été associées à l'action de K-RAS (Ras) pour l'activation de la voie ERK dans les tumeurs pulmonaires humaines CBNPC [296, 297]. Le gène K-RAS, qui est l'activateur dominant de cette voie, peut être constitutivement activé par mutation [298]. L'analyse par séquençage de K-Ras dans l'ensemble des tumeurs radon-induites de rat a été réalisée après amplification par PCR (amorce sens : GCCTGCTGAAAATGACTGAGTAT, amorce anti-sens : AAAGAAAGCCCTCCCCAGTT, TM : 60°C, 1,7 mM MgCl₂) mais n'a révélé aucune mutation. Afin de préciser l'implication préférentielle de cette voie dans les ASq de rat, il serait maintenant intéressant d'étudier l'expression de Mos au niveau protéique et de définir le statut mutationnel de RafB.

Dans la signature AC/ASq, l'expression différentielle des marqueurs spécifiques Muc1 (*mucin*) et Sftpa1 (*surfactant protein*) indique que les AC ont une différenciation glandulaire plus marquée que les ASq. Ces résultats sont, encore une fois, en accord avec une composante épithéliale glandulaire moins représentée dans les ASq que dans les AC. En terme de

différenciation neuroendocrine, le gène *Mst1* (*Macrophage stimulating 1*) est sous-exprimé dans les ASq par rapport aux AC. Ce gène, impliqué dans l'apoptose des cellules neuroendocrines, n'est pas exprimé dans les CBPC humains [299]. Sa plus faible expression dans les ASq laisse supposer la présence d'un contingent plus important de cellules neuroendocrines dans ces tumeurs. Cette hypothèse est confortée par la sur-expression du récepteur cholinergique *Chrna7* associé à la croissance de lignées pulmonaires neuroendocrines [300] et par la sur-expression de l'amphiphysine (*Amph1*) également associée aux cellules endocrines et marqueur des tumeurs gastro-intestinales neuroendocrines [301]. L'analyse immunohistochimique des marqueurs neuroendocrines dans les AC et les Sq a précédemment montré que les AC pouvaient exprimer ces protéines [302]. La signature AC/ASq montre donc que les ASq possèdent non seulement un profil neuroendocrine plus marqué que les Sq mais aussi plus marqué que les AC. Elle met en évidence des spécificités d'expression neuroendocrine pour les ASq qui n'ont jamais été décrites auparavant et qui diffèrent du profil neuroendocrine des AC. Plusieurs études menées sur des CBNPC humains ont mis en évidence une corrélation entre les marqueurs de différenciation neuroendocrine dans les AC ou les CPGC et le pronostic clinique, les tumeurs les plus « neuroendocrines » étant les plus agressives [303, 304]. Si le caractère neuroendocrine différentiel que nous observons dans les trois types de tumeurs de rat se vérifie chez l'homme, il pourrait apporter un élément de réponse quant à la forte agressivité des ASq par rapport aux AC et aux Sq.

Deux transporteurs calciques, régulant la concentration du calcium cytoplasmique, sont sur-exprimés dans les ASq de rat (*Atp2b1* et *Ryr1*), sur-expression associée à celle des récepteurs *Chrna7* et *Trhr*, qui permettent également l'entrée du calcium dans la cellule. La mobilisation du calcium est un élément clé dans l'initiation des différentes cascades mitogéniques [305, 306] et joue un rôle fondamental dans la prolifération des cellules de CBPC [307]. La surexpression de ces gènes dans les ASq pourrait refléter le rôle important, dans ces tumeurs, des voies mitogéniques régulées par le calcium, comme par exemple la voie ERK précédemment ciblée dans la signature ASq/Sq (figure 15). La présence de trois gènes du métabolisme des acides gras dans cette signature (*Echdc1*, *Acs11* et *Lep*) va également dans le sens d'une activation de la prolifération. Les acides gras fournissent, en effet, une réserve en énergie pour de nombreux processus de biosynthèse, tels que la synthèse des acides nucléiques ou des acides aminés, nécessaires à la croissance et à la prolifération cellulaire. Toutes ces données suggèrent que le développement des AC et des ASq pourrait faire intervenir des voies de prolifération différentes.

En conclusion, cette analyse transcriptomique des ASq au regard des AC et des Sq révèle pour la première fois que ces tumeurs complexes correspondent effectivement à un « mélange » des profils AC et Sq sur le plan moléculaire mais qu'elles présentent également des caractéristiques moléculaires propres. Le niveau de différenciation neuroendocrine et les voies de prolifération ERK et Ca²⁺, préférentiellement activées dans ces tumeurs, méritent des analyses plus approfondies afin de définir si ces spécificités peuvent jouer un rôle dans le caractère plus agressif et invasif des ASq par rapport aux AC et aux Sq.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Par des approches génomique, moléculaire et transcriptomique, ce travail nous a permis de mieux caractériser les tumeurs pulmonaires chez le rat, qui présentent de fortes homologues avec les tumeurs pulmonaires humaines CBNPC.

Tout d'abord, au regard des critères anatomo-pathologiques, les profils transcriptomiques des tumeurs AC, Sq et ASq de rat confirment les similarités observées avec les tumeurs humaines. Comparés aux ASq, les AC sur-expriment le marqueur glandulaire *Muc1* et la protéine du surfactant *Sftpa1*, qui sont des marqueurs des cellules de Clara et des pneumocytes II chez l'homme, confirmant l'origine alvéolaire et la nature muco-sécrétante de ces tumeurs. Les Sq, issus de la métaplasie de cellules bronchiolaires chez le rat, ont un profil transcriptomique de différenciation similaire aux Sq bronchiques humains ; par rapport aux AC, ils sur-expriment des marqueurs d'épithélium squameux tels que les constituants des desmosomes et la kératine 5. Etant donné la faible incidence des tumeurs ASq chez l'homme, les données disponibles sont principalement histologiques et cliniques. Ces tumeurs mixtes se caractérisent par un mélange de composantes cellulaires AC et Sq et par une forte agressivité clinique. Une grande proportion d'ASq chez le rat permet une étude approfondie de ces tumeurs sur le plan moléculaire. Entre autre, notre analyse transcriptomique comparative des ASq avec les AC et les Sq a permis de confirmer que les tumeurs mixtes possèdent un profil d'expression qui répond à la définition de mélange. De plus, des spécificités ont été mises en évidence telles que la sur-expression de marqueurs neuroendocrines ou l'activation de la voie Erk, qui pourraient apporter des éléments de réponse quant au caractère fortement agressif de ces tumeurs.

Sur le plan génomique, l'étude par CGH des tumeurs pulmonaires de rat a révélé un profil complexe. Les gains et pertes chromosomiques les plus récurrents chez le rat sont homologues à des régions subissant des déséquilibres chromosomiques fréquents chez l'homme. Ainsi, les régions 5q31-35, 15q et 15p, perdues dans plus de 20 % des tumeurs pulmonaires de rat, correspondent respectivement aux régions humaines 9p21-23, 13q14-32 et 3p14 perdues dans 36 à 83 % des CBNPC [98, 125]. La région 7q34-ter gagnée dans 18 % des tumeurs de notre modèle est homologue au 8q24 humain amplifié dans 10 % des CBNPC [98]. Ces régions sont porteuses de gènes majeurs de la carcinogenèse pulmonaire humaine tels que *p16Ink4a/p14Arf*, *Rb1* ou *c-Myc*, qui se révèlent être autant de gènes candidats pour la carcinogenèse pulmonaire chez le rat. Plus précisément, l'analyse moléculaire du locus *p16Ink4a/p19Arf* a mis en évidence une perte allélique dans 50 % des tumeurs, associée le

plus souvent à une diminution de l'expression de p16^{Ink4a}. Ces résultats sont en accord avec les études de LOH sur les CBNPC humains dans lesquels on retrouve une perte allélique du locus p16^{Ink4a}/p19^{Arf} dans plus de 50 % des tumeurs [127, 128]. Cette homologie se confirme au niveau protéique puisque p16^{Ink4a} n'est détectée par immunohistochimie que dans 50 % des cas chez le rat et l'homme [131]. Nous retrouvons également, dans les deux espèces, une corrélation inverse entre les expressions protéiques de p16^{Ink4a} et pRb. Enfin, la fréquence de la perte de pRb chez le rat (45 %) est équivalente à celle atteinte dans les CBNPC humains [132].

L'ensemble de ces similarités entre l'homme et le rat font de ces tumeurs induites chez le rongeur un outil de choix pour étudier l'effet des faibles doses d'irradiation sur le développement des tumeurs pulmonaires. En effet, à l'heure actuelle, aucune donnée solide ne permet de déterminer s'il existe un risque de cancer aux faibles doses d'irradiation. Quel que soit le type d'irradiation, les approches épidémiologiques pour évaluer ce risque donnent des résultats souvent contradictoires et les données chez l'animal sont limitées. Par principe de précaution, la CIPR base ses recommandations sur une relation dose-effet linéaire sans seuil en appliquant une extrapolation, aux faibles doses, des effets observés chez les survivants d'Hiroshima et de Nagasaki exposés à une irradiation externe aiguë à fortes doses et fort débit de dose. L'estimation du risque de cancer à faibles doses revient à rechercher, s'il existe, un événement peu fréquent, ce qui nécessite, pour être statistiquement robuste, l'étude de cohortes importantes, difficiles à constituer et à suivre. De plus, le débit de dose, rarement pris en compte dans les études épidémiologiques, pourrait avoir un effet sur la fréquence des cancers, comme cela fut proposé à fortes doses chez le rat après inhalation d'émetteurs α [61, 66] : l'augmentation du débit de dose, provoquant une augmentation du nombre de dommages simultanés de l'ADN par cellule, pourrait provoquer la saturation des mécanismes de réparation et le déclenchement de la mort apoptotique des cellules lésées. Enfin, l'exposition des populations à des co-carcinogènes pulmonaires, le plus répandu étant la fumée de cigarette, et l'existence d'une variabilité inter-individuelle de la réponse cellulaire aux radiations augmentent aussi les difficultés rencontrées dans l'appréciation du risque et dans la compréhension des mécanismes de la carcinogenèse pulmonaire. Dans ce sens, l'étude des tumeurs pulmonaires chez le rat permet de limiter les complexités rencontrées chez l'homme. Les rats d'une même souche, possédant un fond génétique maîtrisé, présentent très peu de variabilité interindividuelle et peuvent être exposés à des doses et des débits de doses de

rayonnements ionisants parfaitement définis dans un environnement contrôlé, soit exempt de co-carcinogène pulmonaire, soit volontairement enrichi d'un co-facteur.

Au vu des nombreux avantages du modèle pulmonaire de rat et de ses nombreuses homologies moléculaires avec les tumeurs pulmonaires humaines, plusieurs axes de recherche peuvent être approfondis.

L'exposition de rats à une gamme de faibles doses d'irradiation devrait permettre de définir l'existence ou non d'un risque de cancer du poumon à ces niveaux de dose. S'il existe, il sera alors possible de l'évaluer et ainsi de modéliser la relation entre la dose et la fréquence de cancers pulmonaires chez le rat, jusqu'aux plus faibles doses. Ce travail pourrait permettre de préciser si cette relation est de type linéaire sans seuil, comme proposé dans les études sur les cohortes exposées au radon minier ou domestique, ou si elle présente un seuil comme observé chez le rat après inhalation de Pu. Certains auteurs suggèrent même que cette relation peut être quadratique ou sublinéaire pour des doses très faibles. Nos données sur les tumeurs pulmonaires induites à 100 WLM (0,5 Gy) peuvent dès à présent constituer un point de départ pour l'étude du risque de cancer pulmonaire à de faibles doses de radon chez le rat, cette dose étant équivalente aux plus faibles doses rencontrées chez les mineurs. La gamme de doses à étudier pourrait alors descendre jusqu'à quelques WLM (< 50 mGy), correspondant aux plus faibles doses rencontrées dans les cas d'exposition au radon domestique.

Il serait également intéressant de vérifier s'il existe une variation de cette relation dose-effet entre une irradiation par contamination interne, hétérogène et chronique (car dépendante de la répartition biologique et de la clairance du radioélément), et une irradiation externe, homogène et aiguë. Pour une même dose cumulée finale, le débit de dose serait en effet plus faible après contamination qu'après irradiation, problématique qui soulève la question de l'effet du débit de dose sur la fréquence de cancer. Ce type d'étude apporterait des éléments de réponse quant à la pertinence d'une extrapolation des données sur les survivants d'Hiroshima et Nagasaki aux cas de contamination interne (par exemple après exposition au radon ou au plutonium). Dans ce contexte, nos tumeurs peuvent constituer le groupe de tumeurs induites par contamination interne qui devra être comparé à un groupe de tumeurs pulmonaires induites par irradiation externe aux rayons X ou γ , par exemple.

L'hypothèse d'une spécificité moléculaire des tumeurs pulmonaires radio-induites peut également se poser. En effet, jusqu'à présent, aucune signature moléculaire spécifique capable de refléter la nature radio-induite des tumeurs pulmonaires n'a été mise en évidence, la plupart des études menées en ce sens s'étant focalisées sur la recherche de mutations

ponctuelles sur les gènes Tp53 et K-Ras. Une approche moléculaire basée sur des analyses génomiques plus globales chez le rat permettrait de mettre plus facilement en évidence d'éventuelles distinctions moléculaires entre les tumeurs pulmonaires radio-induites et les tumeurs induites par d'autres carcinogènes. Aujourd'hui, le développement de la technique de séquençage par hybridation sur puces à oligonucléotides permet la recherche de mutations ponctuelles à grande échelle (substitutions, insertions ou petites délétions), ou la mise en évidence de sites de polymorphismes spécifiques touchant un unique nucléotide (SNP pour *Single Nucleotide Polymorphisms*). Une analyse génomique comparative de ce type pourrait par exemple être menée entre un groupe de tumeurs pulmonaires radio-induites incluant, entre autres les tumeurs radon-induites analysées dans ce travail de thèse, et un groupe de tumeurs pulmonaires induites chimiquement, comme par exemple les tumeurs induites par l'agent spécifique de la fumée de cigarette (nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone ou NNK) fréquemment étudiées chez le rongeur. Si une signature moléculaire existe, elle aurait la particularité de mettre à jour un profil d'altérations génétiques spécifique au développement des tumeurs radio-induites chez le rat qui, si il se vérifie chez l'homme, permettrait de générer un outil d'épidémiologie moléculaire pour aider à l'identification des tumeurs pulmonaires radio-induites, en particulier aux faibles doses.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1

Dispositif d'exposition au radon et nature des tumeurs pulmonaires induites chez le rat

Dans le cadre d'études sur les effets carcinogènes du radon et de ses descendants, des rats mâles de souche Sprague Dawley ou Wistar Furth/Fischer F344 (*IFFA CREDO, animaux exempts d'organismes pathogènes spécifiques*) ont été exposés au radon et à ses descendants. Les chambres d'inhalation installées au Laboratoire de Pathologie Pulmonaire Expérimentale (LPPE) du CEA-Université de Limoges (Razès) étaient reliées à une source de radon conditionnée en sous-sol : une cuve souterraine étanche renfermant des résidus de minerai d'uranium d'où le radon s'échappait naturellement (figure 16). Un protocole détaillé a précédemment été décrit par Monchaux et coll. [308]. Des doses de 100 à 1500 WLM ont été reçues par les animaux avec un niveau d'exposition variant de 15 à 150 WL. Une fois rapatriés au Laboratoire de Cancérologie Expérimentale (LCE) du CEA (Fontenay-aux-Roses), les rats ont été fournis en eau et nourriture à volonté et ont été suivis jusqu'à leur mort ou jusqu'à ce qu'ils présentent un état moribond nécessitant alors leur euthanasie par du CO₂. Ces expériences ont été réalisées en accord avec la législation française et les directives européennes concernant l'utilisation et les soins à apporter aux animaux de laboratoire.

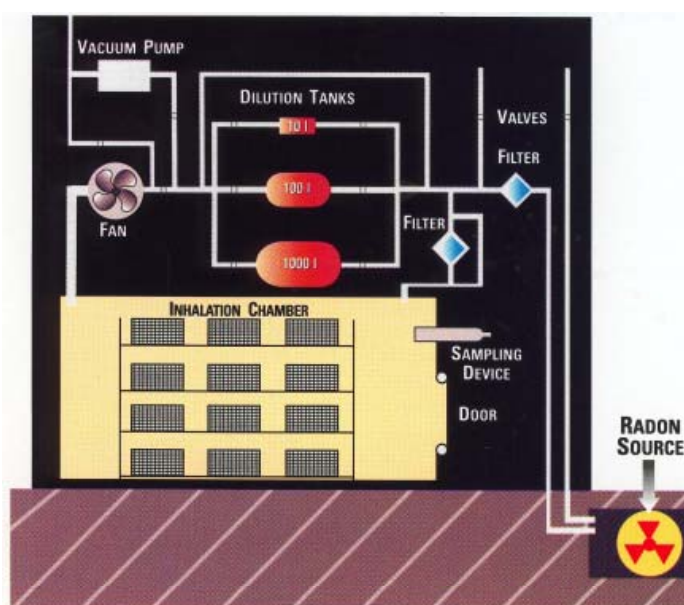


Figure 16 Schéma simplifié des chambres d'inhalation de radon et de ses descendants

Après sacrifice, une fraction de chaque tumeur pulmonaire détectée à l'autopsie a été prélevée et conservée à -80°C pour de futures extractions d'ADN et d'ARN. L'ensemble des poumons de l'animal avec le tissu tumoral restant a été lavé au sérum physiologique, fixé dans une solution tamponnée de formol et inclus en paraffine pour permettre l'examen histologique à partir de sections de tissu colorées à l'Hémalun/Eosine/Safran. Pour tous les échantillons, le diagnostic anatomopathologique a été déterminé en fonction de la classification établie par l'EULEP (pour *European Late Effects Project Group*) [84]. Notre étude porte sur 40 tumeurs collectées sur 18 rats Sprague Dawley et 20 rats Wistar Furth/Fischer F344 (rats hybrides). Cette série de tumeurs comporte 14 adénocarcinomes (AC), 21 carcinomes adénoquameux (ASq) et 5 carcinomes épidermoïdes (Sq). La quantité limitée de matériel ne nous a pas permis d'utiliser la totalité des tumeurs pour l'ensemble des études menées au cours de cette thèse. Des sous-groupes de tumeurs ont dû être constitués pour chaque étude tout en conservant une majorité de tumeurs communes.

Annexe 2

Technique de CGH pour l'analyse cytogénétique des tumeurs pulmonaires

La technique d'hybridation génomique comparative (CGH) a permis de mettre en évidence les déséquilibres chromosomiques présents dans les tumeurs pulmonaires radon-induites de notre série. Elle est basée sur la comparaison de deux génomes (ADN tumoral et ADN de tissu sain) marqués différenciellement puis hybridés simultanément, en quantités équimolaires, sur une préparation de chromosomes métaphasiques normaux [309].

1. Préparation de chromosomes métaphasiques normaux

La préparation des chromosomes métaphasiques a été obtenue à partir de cultures primaires de fibroblastes de fœtus de rat mâle suivant un protocole standard de mise en culture d'explants. Les cellules en phase de croissance exponentielle ont été arrêtées en métaphase par un traitement de deux heures à la colcemide (0,03 µg/ml). Les cellules ont ensuite été récoltées par dissociation enzymatique à la trypsine puis mises en suspension dans une solution hypotonique (0,075 M de KCl) pendant 30 minutes à 37°C. Après des fixations successives par un mélange méthanol / acide acétique (3/1), les suspensions ont été étalées sur des lames de verre propres, humides et froides.

2. Extraction et marquage différentiel des ADN génomiques

L'ADN génomique a été isolé à partir de broyats de tumeurs congelées, selon un protocole standard d'extraction au phénol/chloroforme. L'ADN de tissu sain a été traité de façon identique. Les marquages différentiels de l'ADN normal et tumoral ont été obtenus par « translation de coupure » (*nick translation*) selon un protocole décrit par El-Rifai et coll. [310]. Cette technique permet l'incorporation de deux types de nucléotides directement couplés à un fluorochrome, respectivement le Texas Red-5-dUTP et le FITC-12-dUTP. Tous les marquages ont été réalisés à partir de 1 µg d'ADN génomique en utilisant un mix de *nick translation* (Roche Applied Science). La durée de chaque réaction enzymatique (45 à 120 minutes) a été déterminée afin d'obtenir des fragments d'ADN de 500 à 2000 pb.

3. Hybridation des sondes génomiques

Pour chaque expérience d'hybridation, des quantités égales (500 ng) d'ADN tumoral marqué au FITC (fluorescence verte) et d'ADN normal marqué au Texas Red (fluorescence rouge) ont été mélangées à un excès d'ADN Cot-1 de rat non marqué (10 µg) (*Rat Hybloc competitor DNA, Insight Biotechnology, UK*). Après précipitation, chaque culot a été repris dans 10 µl de solution d'hybridation (50 % formamide, 2X SSC, 10 % sulfate de dextran, 10 mM phosphate de sodium, pH 7) puis dénaturé à 95°C pendant 5 minutes. Après une incubation d'une heure à 42°C, les échantillons ont été déposés sur les métaphases normales de rat (figure 17). Ces métaphases étaient préalablement traitées à la Rnase A (100 µg/ml - 2X SSC) pendant 1 heure à 37°C, dénaturées dans une solution de 70 % formamide / 2X SSC pendant 2 minutes à 70°C, puis fixées dans des bains successifs d'éthanol froid 50 %, 75 % puis 100 %.

Après une hybridation de 72 heures à 42°C en atmosphère humide, les lames ont été lavées par des solutions successives de 50 % formamide / 2X SSC (3 fois), de 2X SSC (2 fois), de 0,1X SSC (1 fois) et de tampon BT (0,15M NaHCO₃, 0,1 % Tween 20, pH 8,3) contenant 0,05 % de BSA (pour *Bovine Serum Albumin*). Enfin, une contre-coloration des chromosomes normaux de rat en pseudo-bandes G a été obtenue par immersion des lames dans une solution BT/BSA contenant 1 µg/ml de DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) pendant 7 minutes. Après un rapide rinçage en solution BT, les lames ont été montées avec une goutte de Vectashield (*Vector laboratories*).

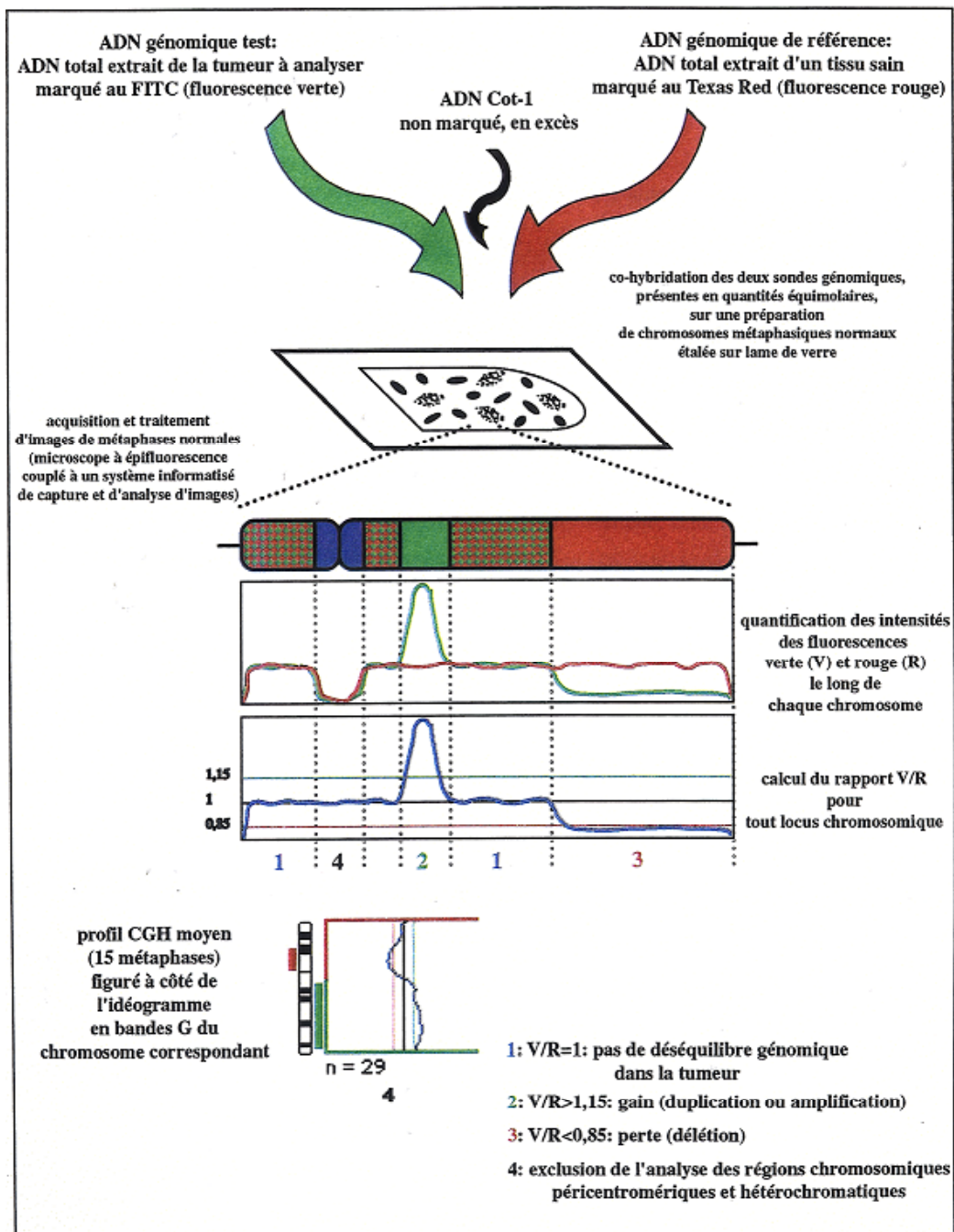


Figure 17 Principe de la technique d'hybridation génomique comparative (CGH)

4. Acquisition et analyse des images, interprétation des profils CGH

L'acquisition des images des métaphases hybridées a été réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence couplé à une caméra et équipé de filtres à bandes passantes spécifiques de chacun des trois fluorochromes (FITC, Texas Red, DAPI). L'analyse de l'image composite de chacune des métaphases à l'aide du module CGH du logiciel QUIPS

(Vysis) permet le classement des chromosomes en bandes G puis la quantification automatique du rapport de fluorescence vert/rouge (V/R) le long de chaque chromosome. Pour chaque tumeur, l'interprétation de la CGH a été réalisée à partir de la compilation de profils provenant de 15 à 20 métaphases correctement hybridées. Les déséquilibres chromosomiques sont indiqués par les déviations du profil CGH moyen par rapport à la valeur $V/R = 1$, qui correspond à une absence d'altération (figure 17). Une région chromosomique est considérée comme étant sur-représentée dans une tumeur lorsque le rapport V/R est supérieur à 1,15 (gains) et sous-représentée lorsque ce rapport est inférieur à 0,85 (pertes). Ces valeurs seuils ont été définies à partir d'analyses préalables, incluant des hybridations témoins de deux ADN normaux mâle et femelle, et des hybridations contrôles réalisées avec des ADN provenant de tumeurs entièrement caractérisées sur le plan caryotypique. Les hybridations témoins ont permis de définir des régions chromosomiques présentant des déviations aspécifiques (1q21, 3p, 9q12, 11p, 12p, 15p13, 16q12.4, 17q12.3, 19p et Y). Toutes les altérations impliquant ces régions ont donc été analysées avec précaution.

Annexe 3

Technique des puces à ADN pour l'analyse transcriptomique des tumeurs pulmonaires

1. Définition et principe expérimental des puces à ADN

Une « puce » à ADN est constituée de fragments d'ADN ou d'oligonucléotides (sondes) immobilisés sur un support solide selon une disposition organisée. Une puce comporte quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers d'unités d'hybridation (spots), chacune étant constituée d'un dépôt de fragments d'ADN ou d'oligonucléotides correspondant à la séquence d'un gène donné. L'hybridation de la puce avec un échantillon biologique d'ADN ou d'ARN, marqué par un radioélément ou par une molécule fluorescente, permet de détecter et de quantifier l'ensemble des cibles qu'il contient en une seule expérience. D'abord conçues sur des membranes poreuses de nylon (appelées parfois « *macroarrays* » par opposition aux « *microarrays* »), les puces à ADN ont été progressivement mises au point sur lames de verre à la fin des années 90.

Notre approche, dans le cadre de ce travail de thèse, est basée sur l'utilisation de puces « *microarray* » portant des oligonucléotides 50 mers de rat. La collection de sondes se compose de 10 000 oligonucléotides de synthèse (*Rat 10K Oligo Set, Ocimum Biosolutions*) correspondant à 6100 gènes de fonction connue, 3560 EST, 100 doublons et 169 contrôles négatifs Arabidopsis. Le dépôt des sondes a été effectué sur lames de verre par la plate-forme génomique du CEA (Evry), avec l'appareil MicroGrid II (*Biorobotics*).

Le principe expérimental utilisé ici a consisté à hybrider, de manière simultanée, l'ADNc de chaque tumeur avec un ADNc de « référence », composé d'un mélange d'ADNc de plusieurs tissus de rat, détaillé plus loin. Cet ADNc de référence, commun à toutes les expériences du laboratoire menées sur le rat, permet d'obtenir un niveau d'expression de base pour l'ensemble des sondes, et de comparer les résultats de plusieurs expériences.

Le principe du protocole d'hybridation est le suivant. Après extraction et amplification des ARNm tumoraux et références, les brins d'ADNc sont synthétisés en présence de nucléotides modifiés couplés à un marqueur fluorescent. L'échantillon tumoral et l'échantillon de référence, marqués par des fluorochromes à spectres d'émission distincts (cyanines Cy3 et Cy5), sont co-hybridés de manière équimolaire sur une même puce. Au contact de la puce, les brins d'ADNc marqués s'apparient avec les sondes de séquence complémentaire de la lame.

La mesure du rapport d'intensité des signaux fluorescents émis sur chaque spot permet ainsi d'estimer le taux d'expression différentiel du gène correspondant.

2. Extraction des ARN, amplification et marquage des ADNc

L'ARN tumoral a été obtenu après broyage et extraction au RNAlplus (*MP Biomedicals Q-BIOgene*) selon le protocole recommandé par le fabricant. L'ARN de référence, composé d'un mélange équimolaire d'ARN provenant de différents tissus sains (poumon, foie, rate, muscle, cerveau) et de lignées cellulaires de rat (rein : NRK52^E et os : CRL 1661 et 1663) (*ATCC*), a été préparé selon la même procédure.

Des quantités égales d'ARN tumoral et d'ARN de référence (5 µg) ont été amplifiées selon les conditions du kit MessageAmpTM aRNA (*Ambion*). Cette amplification comporte les étapes de synthèse de deux brins d'ADNc à partir des ARNm, suivies d'une transcription in vitro pendant une nuit à 37°C en présence de T7 ARN Polymerase. Les ARN amplifiés ainsi obtenus sont des ARN anti-sens (ARNa). Une transcription inverse (*Superscript II, GibcoBRL*), réalisée à partir de 5 µg d'ARNa, conduit à l'obtention d'ADNc sens. La synthèse des seconds brins d'ADNc anti-sens marqués, complémentaires des oligonucléotides sens déposés sur la puce, a été obtenue par amorçage aléatoire (*Random Priming - Roche Diagnostics*). La réaction se déroule dans un volume final de 50 µl pendant une nuit à 37°C en présence de dATP, dGTP et dCTP (200 µM final), de dTTP (130 µM final) et de Cy3-dUTP ou Cy5-dUTP (70 µM final, *Amersham*). L'ensemble de ces étapes nous a permis d'hybrider des solutions d'ADNc, moins sujets à la dégradation que les ARN.

3. Hybridation des cibles d'ADNc

Pour chaque échantillon expérimental, deux hybridations croisées sont recommandées en inversant les fluorochromes (*dye-swap*) [311, 312] (figure 18). Une première hybridation est effectuée avec 5 µg d'ADNc tumoral marqué au Cy3 et 5 µg d'ADNc référence marqué au Cy5. La seconde hybridation est réalisée sur une deuxième lame avec les marquages inverses. Lors du traitement du signal, cette hybridation en double inverse permet de détecter et de corriger les facteurs de variabilité tels que la différence d'incorporation des fluorochromes, les rendements de fluorescence ou les variations expérimentales dues aux prélèvements, aux dosages des ARN...

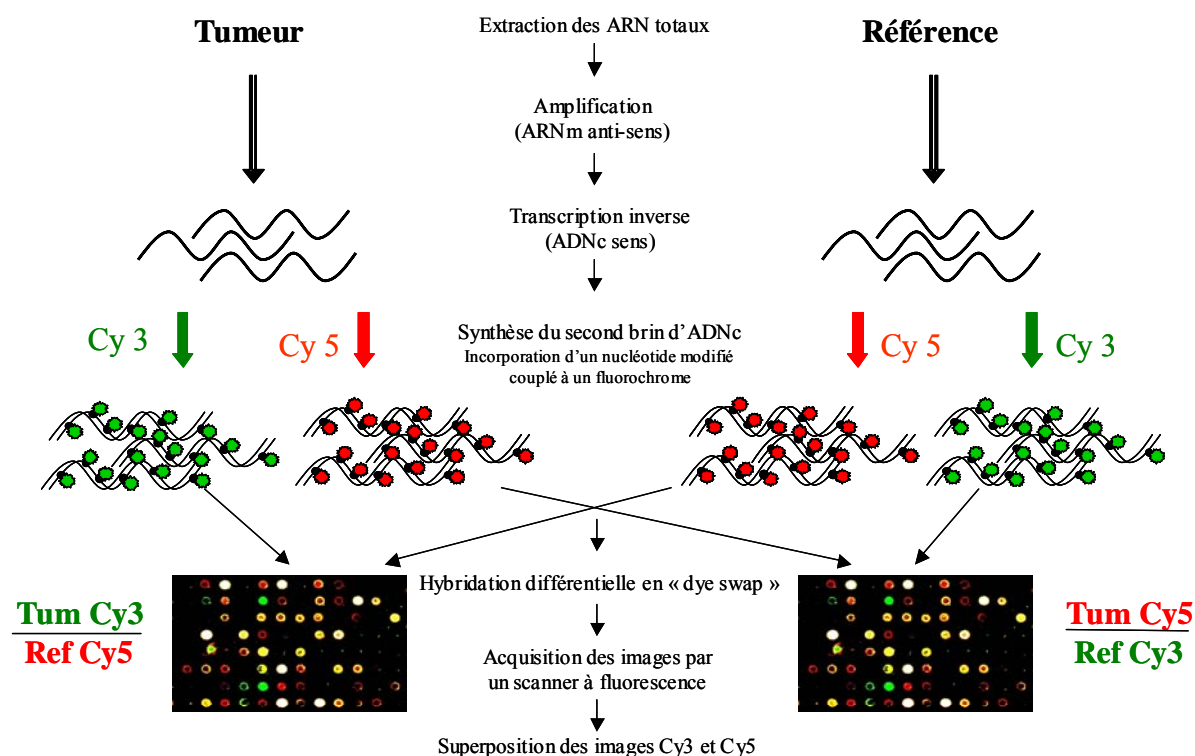


Figure 18 Principe de l'hybridation sur puces à ADN

Hybridation différentielle en « dye-swap »

L'hybridation compétitive des échantillons sur puce a donc nécessité la préparation de deux mélanges équimolaires d'ADNc tumoraux et référentiels marqués respectivement en Cy3 et en Cy5, et inversement. Chaque mélange a ensuite été purifié par précipitation alcoolique en présence de séquences poly(A) (20µg), d'ARNt de levure (yeast tRNA, 20µg) et d'ADN Cot-1 de rat (20 µg) (*Rat Hybloc competitor DNA, Insight Biotechnology, UK*). Après précipitation, chaque culot a été repris dans 50 µl de solution d'hybridation (50 % formamide / 10X SSC / 0,2 % SDS) et dénaturé à 95°C pendant 5 minutes. Après une heure à 42°C, les échantillons ont été déposés sur les lames d'oligonucléotides préalablement traitées avec un tampon de pré-hybridation (1% BSA / 5X SSC / 0.1% SDS). L'hybridation se déroule en atmosphère humide à 42°C sur une nuit. Les lames sont ensuite lavées par des solutions successives de 1X SSC / 0,2 % SDS (42°C), de 0,1X SSC / 0,2 % SDS, de 0,1X SSC et d'eau, puis séchées par centrifugation.

4. Acquisition et analyse des données

A/ Acquisition des images

Après hybridation, chaque lame est scannée à une résolution de 10 μm avec un scanner confocal (*Scan array Express, PerkinElmer*) aux deux longueurs d'ondes (Cy3 = 532 nm et Cy5 = 635 nm), correspondant aux marquages des deux échantillons hybridés. Pour chaque longueur d'onde d'excitation, deux acquisitions sont effectuées avec des réglages de puissance laser et de gains de photomultiplicateur différents, favorisant respectivement les spots faiblement hybridés (les spots fortement hybridés sont saturés) et les spots fortement hybridés (les spots faiblement hybridés sont invisibles).

Deux images sont obtenues pour chaque marquage au format TIFF codant sur 16 bits compris entre 0 (noir) et 65535 (blanc) niveaux de gris. La gamme d'intensité du signal d'hybridation détecté est étendue par chevauchement des signaux provenant des deux images. Les étapes suivantes, allant du traitement des images à la détermination des rapports d'expression pour chaque gène, ont été effectuées par Nicolas Ugolin à l'aide de logiciels développés par l'équipe de bio-informatique du laboratoire.

B/ Quantification et normalisation des rapports d'expression des gènes

a) Élimination du bruit de fond

La position de chaque spot est automatiquement déterminée pour chaque image à l'aide d'un système de positionnement de grilles basé sur l'algorithme SurfView (*Image-analysis spot-tracking software* - patent US 10/173,672 June, 19, 2002; CA 2,389,901 June, 20, 2002) qui utilise la périodicité du dépôt.

Pour chaque image, les pixels provenant de chaque spot, circonscrits dans un cercle, sont segmentés en bruit de fond local et signaux d'hybridation, selon un algorithme spécifique d'estimation-maximisation. L'intensité d'hybridation est estimée comme l'intensité moyenne des pixels d'hybridation soustraite à l'intensité moyenne des pixels du bruit de fond.

b) Calcul d'un facteur de reproductibilité

La co-hybridation d'ADNc tumoraux et référentiels décrite précédemment implique que chaque niveau d'expression tumoral sera exprimé en fonction d'un niveau de référence.

Dans la suite de l'exposé, l'échantillon tumoral sera noté « Exp » (expérience) et l'échantillon de référence sera noté « Ref ».

Une hybridation en double inverse permet, pour chaque sonde, de normaliser et de réduire l'erreur commise entre les deux mesures réalisées pour l'échantillon tumoral et pour la référence. En effet, l'analyse puce de chaque tumeur aboutit à la mesure de quatre valeurs :

- hybridation 1 : l'échantillon tumoral (Exp) marqué au Cy5 est hybridé avec l'échantillon de référence (Ref) marqué au Cy3.
- hybridation 2 : l'échantillon tumoral (Exp) marqué au Cy3 est hybridé avec l'échantillon de référence (Ref) marqué au Cy5.

Les valeurs mesurées peuvent être affectées d'un biais induit par des facteurs tels que la variation du dépôt des sondes sur la puce, la variation de puissance du laser ou l'inhomogénéité du marquage par les fluorochromes Cy3 et Cy5. L'impact du biais sur les mesures est minimisé grâce aux couples de valeurs Ref Cy3 / Ref Cy5 ou Exp Cy3 / Exp Cy5 de l'hybridation en double inverse. Chaque couple est placé sur un diagramme (figure 19) et un nuage de points est obtenu dont on peut calculer la régression linéaire. L'écart entre cette régression linéaire et la droite de pente 1 et d'origine 0 est représentative de l'erreur systématique commise. Afin de minimiser cette erreur, les paramètres de la rotation et de la translation nécessaires pour ramener la droite de régression vers une droite de pente 1 et d'origine 0 sont appliqués à l'ensemble des couples de mesures.

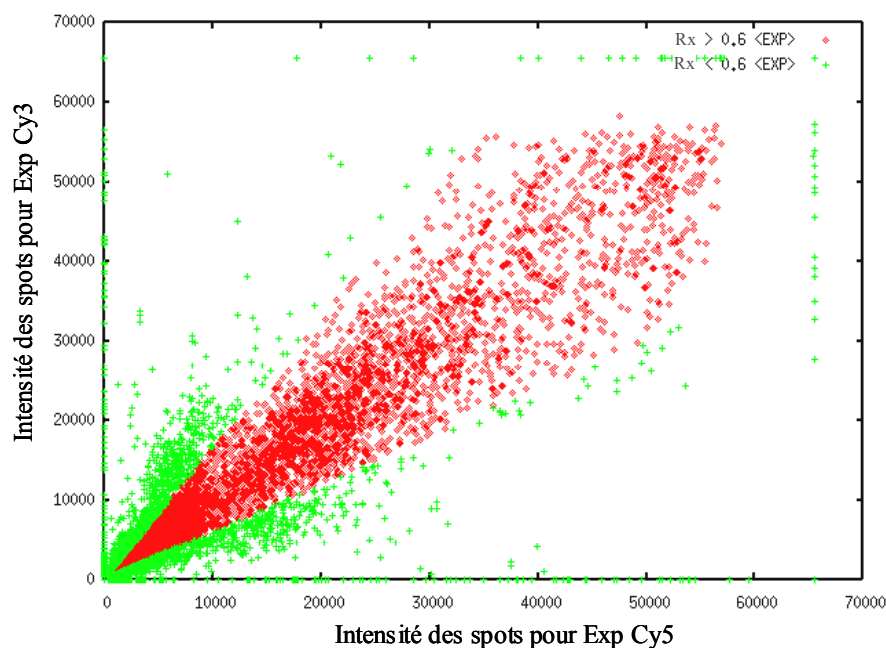


Figure 19 Détermination de la reproductibilité du couple de valeurs Exp Cy3 / Exp Cy5

La dispersion du nuage de points autour de la droite de régression est représentative des erreurs sporadiques commises. Ces erreurs sont liées, pour chaque valeur mesurée, à des facteurs de variabilité tels que l'incertitude de la mesure, les variations de densité de sonde pour chaque spot ou la variation d'incorporation séquence-spécifique entre les deux fluorochromes.

Pour chaque couple de valeurs Ref Cy3 / Ref Cy5 et Exp Cy3 / Exp Cy5 est défini un facteur de reproductibilité Rt et Rx respectivement, tel que :

$$Rt_i = \frac{\frac{(Ref_1)_i}{\sum Ref_1}}{\frac{(Ref_2)_i}{\sum Ref_2}} \quad \text{et} \quad Rx_i = \frac{\frac{(Exp_2)_i}{\sum Exp_2}}{\frac{(Exp_1)_i}{\sum Exp_1}}$$

(1 et 2 correspondent respectivement aux fluorochromes Cy3 et Cy5 et i indique le numéro du spot sur les deux lames).

Ce facteur de reproductibilité représente le rapport de la fluorescence d'hybridation d'un spot i par rapport à la fluorescence totale du signal d'hybridation et indique l'erreur sporadique commise sur la mesure des sondes entre les deux lames d'une hybridation en double inverse.

Afin de placer ces facteurs de reproductibilité sur une échelle relative de 0 à 1 (1 étant la qualité maximum de reproductibilité), les Rt et Rx supérieurs à 1 sont ramenés respectivement à Rt^{-1} et Rx^{-1} .

Un filtre-seuil à 0,6 est alors imposé sur les Rt et Rx de chaque sonde afin de ne sélectionner que les mesures les plus reproductibles représentées en rouge sur la figure 19.

c) Calcul des niveaux d'expression

Une fois que les facteurs de reproductibilité Rt et Rx ont été calculés pour chaque spot, il reste à définir le niveau d'expression Exp/Ref (noté x/y) pour chaque hybridation en double inverse. Différents cas doivent être considérés en fonction de Rt et Rx :

- quand $Rt.Rx \approx 1$ et $Rt/Rx \neq 1$, l'erreur sporadique mesurée est due à la variation de la mesure entre les deux lames (due par exemple à une variation de densité de la sonde entre les deux lames). Les rapports Exp_{Cy3}/Ref_{Cy3} et Exp_{Cy5}/Ref_{Cy5} sont équivalents. La valeur finale du niveau d'expression x/y correspond alors à la moyenne des valeurs Exp_{Cy3}/Ref_{Cy3} et Exp_{Cy5}/Ref_{Cy5} pondérée de la valeur $Rf = Rt.Rx$;

- quand $R_t.R_x \neq 1$ et $R_t/R_x \approx 1$, l'erreur sporadique mesurée découle d'un biais entre la tumeur et la référence (dû par exemple au biais d'incorporation entre les fluorochromes Cy3 et Cy5). Les rapports Exp_{Cy5}/Ref_{Cy3} et Exp_{Cy3}/Ref_{Cy5} sont équivalents. La valeur finale du niveau d'expression x/y correspond alors à la moyenne des valeurs Exp_{Cy5}/Ref_{Cy3} et Exp_{Cy3}/Ref_{Cy5} pondérée de la valeur $R_f = R_t/R_x$;
- quand $R_t.R_x \approx 1$ et $R_t/R_x \approx 1$, toutes les mesures sont reproductibles, la valeur finale du niveau d'expression x/y est alors la moyenne des valeurs intra et inter-lames Exp_{Cy3}/Ref_{Cy3} , Exp_{Cy5}/Ref_{Cy5} , Exp_{Cy3}/Ref_{Cy5} et Exp_{Cy5}/Ref_{Cy3} pondérée de la valeur $R_f = (R_t.R_x \cdot R_t/R_x)^{1/2}$;
- quand $R_t.R_x \neq 1$ et $R_t/R_x \neq 1$, les valeurs Exp/Ref sont éliminées.

Une hybridation en double inverse est validée lorsque 80 % des niveaux d'expression présentent un $R_f \geq 0.6$.

d) Normalisation

Le niveau d'expression x/y défini ci-dessus, informe sur le niveau de modulation d'un gène donné. La distribution des niveaux d'expression de l'ensemble des gènes s'étend de 0 à + l'infini (figure 20.1) avec un maximum normalement situé à 1 qui représente la population de gènes invariants [313], majoritaires sur une puce pangénomique. Toutefois, cette distribution peut être décalée en raison, par exemple, d'un déséquilibre global de la quantité de matériel déposé entre la tumeur et la référence. Pour corriger ce biais qui persisterait même après les étapes de normalisation précédentes, une homothétie est appliquée au nuage de point x/y de telle manière que la majorité relative des points du nuage soit localisée sur une droite de pente 1 passant par 0.

L'erreur commise sur une répression comprise entre 0 et 1 ($x < y$) n'a pas la même dimension que celle commise sur une induction comprise entre 1 et + l'infini ($x > y$). Pour donner aux erreurs, donc aux mesures, des dimensions comparables, nous calculons le rapport y/x sur l'intervalle $[0 ; 1]$ (figure 20.2). Pour manipuler et analyser les données, les ratios d'expression sont usuellement transformés dans une échelle logarithmique qui permet de transformer la distribution des ratios d'expression en une fonction symétrique de - l'infini à +

l'infini, centrée sur 0 et additive, ce qui facilite les analyses statistiques. Les rapports d'expression X sont donc définis tels que $X = -\ln(y/x)$ pour une répression et $X = \ln(x/y)$ pour une induction (figure 20.3).

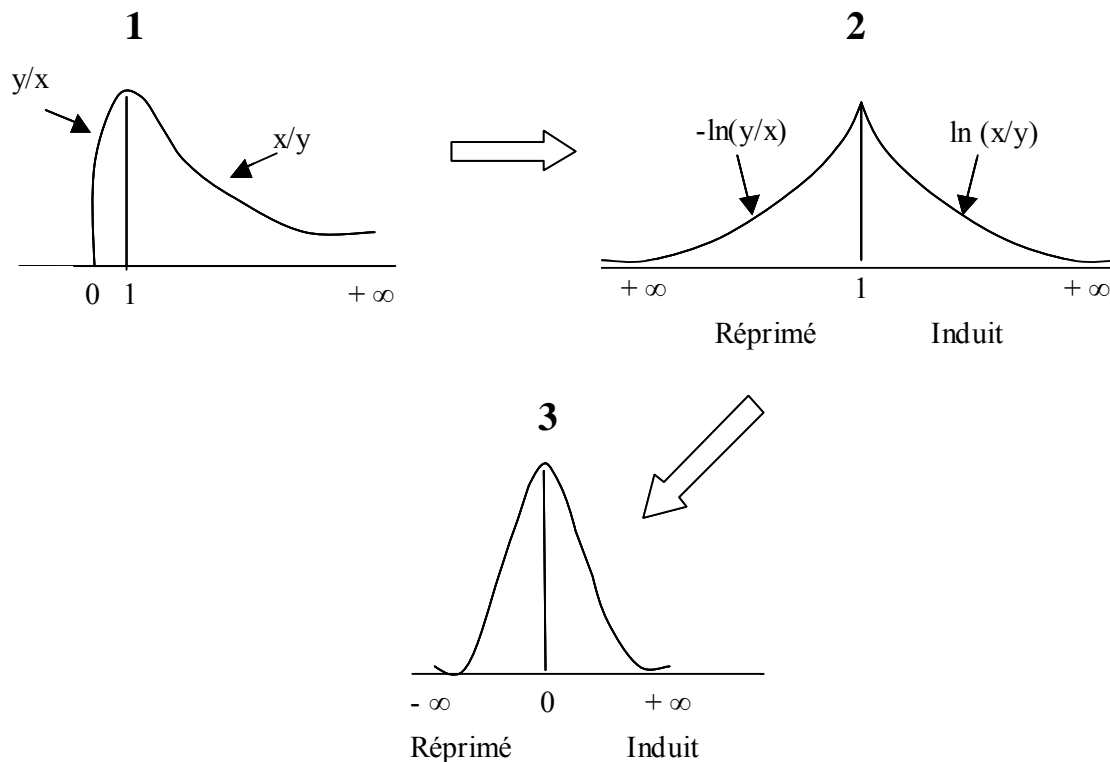


Figure 20 Normalisation des rapports d'expression d'une hybridation en double inverse

e) Construction des profils d'expression des gènes entre les différents cas

Les niveaux d'expression de l'ensemble des gènes pour toutes les tumeurs sont alors regroupées et organisées dans une matrice N.P, où les lignes N représentent les gènes et les colonnes P représentent les tumeurs. Chaque ligne de la matrice correspond aux niveaux d'expressions d'un gène entre les différentes tumeurs (assimilable à un point dans un espace à P dimensions). Pour éliminer le niveau de modulation de base des gènes, qui n'intervient pas pour l'analyse souhaitée, chaque profil est centré par rapport à sa moyenne. Cela permet d'analyser un gène donné entre toutes les conditions et de fixer un référentiel commun pour l'ensemble des profils.

L'analyse effectuée sur cette matrice dépend ensuite de la question posée. Dans le cas présent, nous recherchons les profils de gènes exprimés différemment entre deux types de tumeurs mais invariants pour un même type. La difficulté est de minimiser le nombre de gènes présentant de tels profils par hasard et cela malgré le petit nombre de tumeurs. Un premier

filtre, consistant à réaliser un t-test entre les deux types de tumeurs A et B, permet d'éliminer rapidement les gènes ne correspondant pas au profil souhaité et de ne conserver que les gènes dont la moyenne d'expression diffère entre les deux types. La limite d'élimination d'un gène est fixée automatiquement à partir d'un seuil calculé sur toutes les permutations possibles entre les deux types A et B.

Toutefois, suite à ce premier tri, certains des gènes conservés peuvent présenter des erreurs ponctuelles dans leur profil, alors même que les moyennes pour les deux groupes sont significativement différentes. Pour éliminer ce type de gène, il est indispensable de disposer d'une loi de probabilité adaptée à la taille des échantillons analysés.

Afin de définir cette loi, les niveaux d'expression sont normalisés c'est-à-dire qu'ils sont réduits d'un espace $[-\infty ; \infty]$ à un espace $[-1 ; 1]$ tel que :

$$X''_{i,j} = \frac{X'_{i,j}}{\sqrt{\sum_{j=1}^p X'^2_{i,j}}}$$

i et j représentent respectivement les index des lignes (gènes) et des colonnes (tumeurs) de la matrice N.P. X' est la valeur du niveau d'expression obtenu après centrage à la position (i,j) de la matrice.

Dans ce nouvel espace, la distribution des niveaux d'expression suit une loi centrée sur 0 dont la densité de probabilité est calculée en chaque point. Il devient alors possible de définir pour la tumeur j la probabilité de trouver par hasard un niveau d'expression $X''_{i,j}$ dans un intervalle donné.

C/ Définition d'une signature

A l'aide de la loi de distribution précédemment calculée, il est possible de sélectionner finement les profils d'expression de gènes qui présentent une grande probabilité d'être différents entre les deux types de tumeurs A et B. A priori, si le t-test est significatif et si une signature qui différencie strictement les deux groupes A et B existe, alors :

- 1) quelque soit le gène et le groupe, il existe une loi décrivant la distribution des inductions qui est significativement différente de celle décrivant la distribution des répressions ;
- 2) parmi les gènes sélectionnés par le t-test, il existe des profils i pour lesquels toutes les coordonnées $X''_{A,j}$ sont significativement différentes des coordonnées $X''_{B,j}$.

Ces deux propositions sont illustrées par la figure 21. Quand ces conditions sont remplies, une signature différenciant les deux groupes A et B existe qui se décompose en deux groupes de profils : réprimé/induit et induit/réprimé.

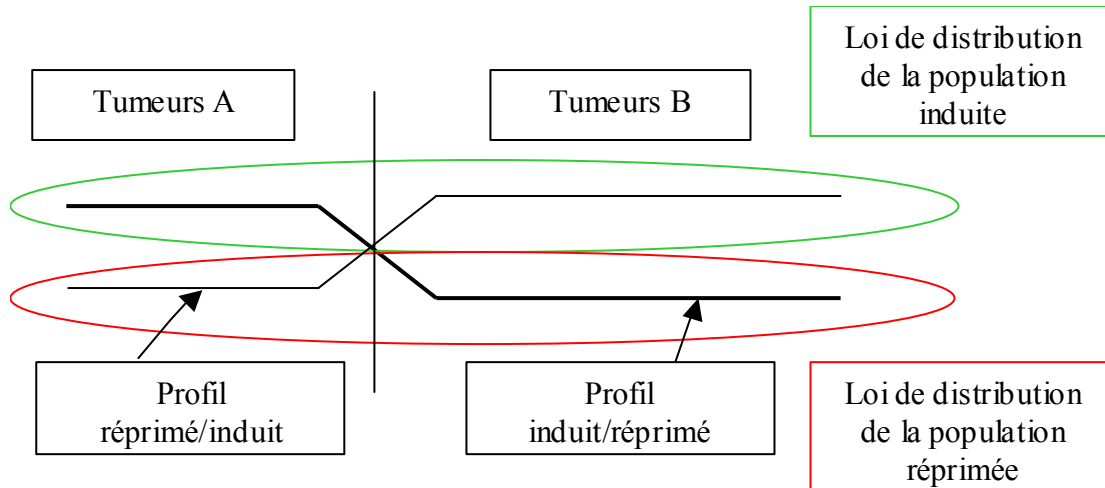


Figure 21 Conditions nécessaires à la validation d'une signature qui différencie les tumeurs A des tumeurs B

Pour vérifier la première proposition, nous recherchons s'il est possible de modéliser deux lois de distribution qui décrivent les populations induites ($X''_{ij} > 0$) et les populations réprimées ($X''_{ij} < 0$), quelque soit le groupe de tumeurs. Ces lois sont calculées par un algorithme d'estimation-maximisation EM (développé par N. Ugolin) qui permet la convergence par minimisation du RMS (*root mean square*) de la fonction bimodale de mélange des deux lois calculées et la fonction de distribution réelle des niveaux d'expression (figure 22).

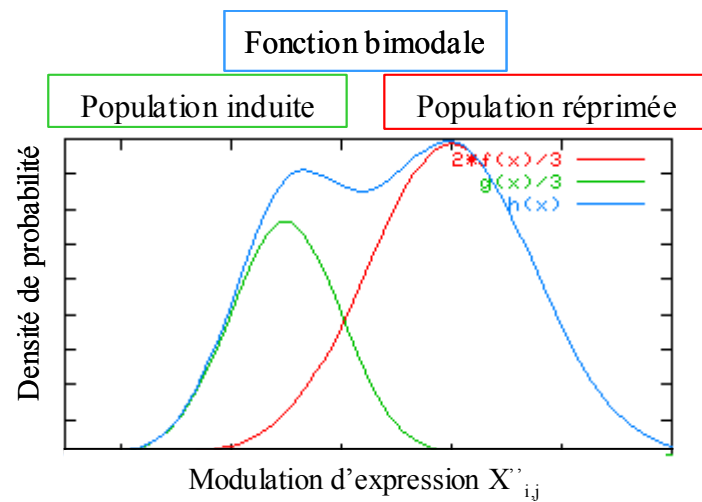


Figure 22 Lois de distribution des populations induites et réprimées permettant de calculer la fonction bimodale. La fonction de distribution réelle des niveaux d'expression se confond avec la fonction bimodale calculée.

Ces lois permettent d'estimer la probabilité du niveau d'expression X'' d'un gène i donné dans un cas j d'être induit ou réprimé.

Disposant de ces probabilités, la seconde proposition est vérifiée s'il existe des gènes pour lesquels il n'y a aucune contradiction entre les probabilités calculées d'induction – répression de toutes les coordonnées d'un profil et le profil induit-réprimé ou réprimé-induit défini par le t-test. Cette procédure permet d'évaluer automatiquement la cohérence des données sans avoir à définir arbitrairement un seuil de p-value.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Houtgraaf, J.H., J. Versmissen, and W.J. van der Giessen, *A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells*. Cardiovasc Revasc Med, 2006. **7**(3): p. 165-72.
2. Hoeijmakers, J.H., *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 366-74.
3. Zharkov, D.O., *Base excision DNA repair*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(10): p. 1544-65.
4. Fousteri, M. and L.H. Mullenders, *Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects*. Cell Res, 2008. **18**(1): p. 73-84.
5. Weterings, E. and D.J. Chen, *The endless tale of non-homologous end-joining*. Cell Res, 2008. **18**(1): p. 114-24.
6. Cahill, D., B. Connor, and J.P. Carney, *Mechanisms of eukaryotic DNA double strand break repair*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 1958-76.
7. Saintigny, Y., et al., *Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells*. Embo J, 2001. **20**(14): p. 3861-70.
8. Wang, H., et al., *Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group*. Oncogene, 2001. **20**(18): p. 2212-24.
9. Al-Minawi, A.Z., N. Saleh-Gohari, and T. Helleday, *The ERCC1/XPF endonuclease is required for efficient single-strand annealing and gene conversion in mammalian cells*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(1): p. 1-9.
10. Qin, J. and L. Li, *Molecular anatomy of the DNA damage and replication checkpoints*. Radiat Res, 2003. **159**(2): p. 139-48.
11. Kastan, M.B. and J. Bartek, *Cell-cycle checkpoints and cancer*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 316-23.
12. Bouchet, B.P., et al., *p53 as a target for anti-cancer drug development*. Crit Rev Oncol Hematol, 2006. **58**(3): p. 190-207.
13. Gallagher, S.J., R.F. Kefford, and H. Rizos, *The ARF tumour suppressor*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(10): p. 1637-41.
14. Lukas, J., C. Lukas, and J. Bartek, *Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 997-1007.
15. Niida, H. and M. Nakanishi, *DNA damage checkpoints in mammals*. Mutagenesis, 2006. **21**(1): p. 3-9.
16. Baatout, S., et al., *[Mechanisms of radio-induced apoptosis]*. Can J Physiol Pharmacol, 2002. **80**(7): p. 629-37.
17. Fridman, J.S. and S.W. Lowe, *Control of apoptosis by p53*. Oncogene, 2003. **22**(56): p. 9030-40.
18. Zhou, L., R. Yuan, and L. Serggio, *Molecular mechanisms of irradiation-induced apoptosis*. Front Biosci, 2003. **8**: p. d9-19.
19. Thacker, J., *The nature of mutants induced by ionising radiation in cultured hamster cells. III. Molecular characterization of HPRT-deficient mutants induced by gamma-rays or alpha-particles showing that the majority have deletions of all or part of the hprt gene*. Mutat Res, 1986. **160**(3): p. 267-75.
20. Yandell, D.W., T.P. Dryja, and J.B. Little, *Somatic mutations at a heterozygous autosomal locus in human cells occur more frequently by allele loss than by intragenic structural alterations*. Somat Cell Mol Genet, 1986. **12**(3): p. 255-63.

21. Li, C.Y., D.W. Yandell, and J.B. Little, *Molecular mechanisms of spontaneous and induced loss of heterozygosity in human cells in vitro*. Somat Cell Mol Genet, 1992. **18**(1): p. 77-87.
22. Amundson, S.A., et al., *Different cytotoxic and mutagenic responses induced by X-rays in two human lymphoblastoid cell lines derived from a single donor*. Mutat Res, 1993. **286**(2): p. 233-41.
23. Chang, W.P. and J.B. Little, *Persistently elevated frequency of spontaneous mutations in progeny of CHO clones surviving X-irradiation: association with delayed reproductive death phenotype*. Mutat Res, 1992. **270**(2): p. 191-9.
24. Little, J.B., et al., *Radiation-induced genomic instability: delayed mutagenic and cytogenetic effects of X rays and alpha particles*. Radiat Res, 1997. **148**(4): p. 299-307.
25. Grosovsky, A.J., et al., *Clonal analysis of delayed karyotypic abnormalities and gene mutations in radiation-induced genetic instability*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(11): p. 6252-62.
26. Kadhim, M.A., et al., *Transmission of chromosomal instability after plutonium alpha-particle irradiation*. Nature, 1992. **355**(6362): p. 738-40.
27. Limoli, C.L., et al., *Chromosomal instability induced by heavy ion irradiation*. Int J Radiat Biol, 2000. **76**(12): p. 1599-606.
28. Holmberg, K., et al., *Clonal chromosome aberrations and genomic instability in X-irradiated human T-lymphocyte cultures*. Mutat Res, 1993. **286**(2): p. 321-30.
29. Dubrova, Y.E. and M.A. Plumb, *Ionising radiation and mutation induction at mouse minisatellite loci. The story of the two generations*. Mutat Res, 2002. **499**(2): p. 143-50.
30. Kodaira, M., et al., *No evidence of radiation effect on mutation rates at hypervariable minisatellite loci in the germ cells of atomic bomb survivors*. Radiat Res, 2004. **162**(4): p. 350-6.
31. IAEA, *Practical radiation technical manual: Health effects and medical surveillance*. 2004, Vienna: IAEA-PRTM-3.
32. Ron, E., et al., *Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part IV: Comparison of cancer incidence and mortality*. Radiat Res, 1994. **137**(2 Suppl): p. S98-112.
33. Thompson, D.E., et al., *Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part II: Solid tumors, 1958-1987*. Radiat Res, 1994. **137**(2 Suppl): p. S17-67.
34. Preston, D.L., et al., *Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998*. Radiat Res, 2007. **168**(1): p. 1-64.
35. Preston, D.L., et al., *Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987*. Radiat Res, 1994. **137**(2 Suppl): p. S68-97.
36. Cardis, E., et al., *Cancer consequences of the Chernobyl accident: 20 years on*. J Radiol Prot, 2006. **26**(2): p. 127-40.
37. Balonov, M.I., *The Chernobyl Forum: major findings and recommendations*. J Environ Radioact, 2007. **96**(1-3): p. 6-12.
38. Ron, E., et al., *Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies*. Radiat Res, 1995. **141**(3): p. 259-77.
39. Cardis, E., et al., *Risk of thyroid cancer after exposure to ¹³¹I in childhood*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(10): p. 724-32.
40. Rahu, M., et al., *Cancer risk among Chernobyl cleanup workers in Estonia and Latvia, 1986-1998*. Int J Cancer, 2006. **119**(1): p. 162-8.

41. Ivanov, V.K., et al., *Thyroid cancer incidence among liquidators of the Chernobyl accident. Absence of dependence of radiation risks on external radiation dose*. Radiat Environ Biophys, 2002. **41**(3): p. 195-8.
42. Howe, G.R., *Leukemia following the Chernobyl accident*. Health Phys, 2007. **93**(5): p. 512-5.
43. Ivanov, V.K., et al., *Solid cancer incidence among the Chernobyl emergency workers residing in Russia: estimation of radiation risks*. Radiat Environ Biophys, 2004. **43**(1): p. 35-42.
44. Ivanov, V.K., et al., *Cancer risks in the Kaluga oblast of the Russian Federation 10 years after the Chernobyl accident*. Radiat Environ Biophys, 1997. **36**(3): p. 161-7.
45. Shilnikova, N.S., et al., *Cancer mortality risk among workers at the Mayak nuclear complex*. Radiat Res, 2003. **159**(6): p. 787-98.
46. Sokolnikov, M.E., et al., *Lung, liver and bone cancer mortality in Mayak workers*. Int J Cancer, 2008. **123**(4): p. 905-911.
47. Khokhryakov, V., et al., *Development of an improved dosimetry system for the workers at the Mayak Production Association*. Health Phys, 2000. **79**(1): p. 72-6.
48. ICRP, *Protection against Radon-222 at home and at work : publication 65*. 1994, International Commission on Radiological Protection Oxford.
49. Godet, J.L., et al., *Le contrôle des expositions au radon, France, decembre 2006*. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire thématique, 2007. **18-19**: p. 163-5.
50. Porstendorfer, J., *Properties and behaviour of radon and thoron and their decay products in the air*. J. Aerosol Sci., 1994. **25**(2): p. 219-63.
51. IARC, *Man-Made mineral fibres and radon*. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to human, 1988. **43**.
52. NCRP, *Evaluation of occupational and environmental exposure to radon and radon daughter in the United States*. 1984, National Council on Radiation Protection and Measurements: Bethesda, MD.
53. Hubert, P. and D. Laurier, *Exposition au radon : unités et coefficients de conversion (d'après la CIPR 26)*. 2000, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire: Fontenay-aux-Roses.
54. Lubin, J.H., et al., *Radon and lung cancer risk: A joint analysis of 11 underground miner studies*. National Institutes of Health: NIH, 1994. **Publication n°94-3644**.
55. Lubin, J.H., et al., *Lung cancer in radon-exposed miners and estimation of risk from indoor exposure*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(11): p. 817-27.
56. Laurier, D., et al., *Risques associés au radon : l'apport des études de mineurs*. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire thématique, 2007. **18-19**.
57. Darby, S.C., et al., *Radon and cancers other than lung cancer in underground miners: a collaborative analysis of 11 studies*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(5): p. 378-84.
58. Laurier, D., M. Valenty, and M. Tirmarche, *Radon exposure and the risk of leukemia: a review of epidemiological studies*. Health Phys, 2001. **81**(3): p. 272-88.
59. Mohner, M., et al., *Leukemia and exposure to ionizing radiation among German uranium miners*. Am J Ind Med, 2006. **49**(4): p. 238-48.
60. Darby, S., et al., *Exposition au radon dans les habitations et risque de cancer du poumon : analyse conjointe des données individuelles de 13 études cas-témoins européennes*. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire thématique, 2007. **18-19**.
61. Collier, C.G., et al., *Carcinogenicity of radon/radon decay product inhalation in rats--effect of dose, dose rate and unattached fraction*. Int J Radiat Biol, 2005. **81**(9): p. 631-47.

62. Oghiso, Y. and Y. Yamada, *Comparisons of pulmonary carcinogenesis in rats following inhalation exposure to plutonium dioxide or X-ray irradiation*. J Radiat Res (Tokyo), 2003. **44**(3): p. 261-70.
63. Dudoignon, N., K. Guillet, and P. Fritsch, *Evaluation of risk factors for lung tumour induction in rats exposed to either NpO(2) or PuO(2) aerosols*. Int J Radiat Biol, 2003. **79**(3): p. 169-74.
64. Monchaux, G. and P. Duport, *Health effects on inhaled radon progeny*. Radioprotection, 1997. **32**: p. C1~351-8
65. Oghiso, Y., et al., *Differential dose responses of pulmonary tumor types in the rat after inhalation of plutonium dioxide aerosols*. J Radiat Res (Tokyo), 1998. **39**(1): p. 61-72.
66. Mitchel, R.E., J.S. Jackson, and B. Heinmiller, *Inhaled uranium ore dust and lung cancer risk in rats*. Health Phys, 1999. **76**(2): p. 145-55.
67. Ferlay, J., et al., *Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006*. Ann Oncol, 2007. **18**(3): p. 581-92.
68. Brambilla, E., *[Classification of broncho-pulmonary cancers (WHO 1999)]*. Rev Mal Respir, 2002. **19**(4): p. 455-66.
69. Gazdar, A.F., et al., *Small Cell Lung Cancer*, ed. A. Greco, P.A. Bunn, and R. Oldham. 1980, Grune and Stratton, New York.
70. Weynants, P., et al., *Biology of small cell lung cancer: an overview*. Eur Respir J, 1990. **3**(6): p. 699-714.
71. Tokarskaya, Z.B., et al., *The influence of radiation and nonradiation factors on the lung cancer incidence among the workers of the nuclear enterprise Mayak*. Health Phys, 1995. **69**(3): p. 356-66.
72. Kreuzer, M., et al., *Histopathologic findings of lung carcinoma in German uranium miners*. Cancer, 2000. **89**(12): p. 2613-21.
73. Torre, G.C., *SCC antigen in malignant and nonmalignant squamous lesions*. Tumour Biol, 1998. **19**(6): p. 517-26.
74. Moran, C.A., *Pulmonary adenocarcinoma: the expanding spectrum of histologic variants*. Arch Pathol Lab Med, 2006. **130**(7): p. 958-62.
75. Molina, R., et al., *Tumor markers (CEA, CA 125, CYFRA 21-1, SCC and NSE) in patients with non-small cell lung cancer as an aid in histological diagnosis and prognosis. Comparison with the main clinical and pathological prognostic factors*. Tumour Biol, 2003. **24**(4): p. 209-18.
76. Hage, R., et al., *Pulmonary large-cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC)*. Eur J Cardiothorac Surg, 2003. **23**(4): p. 457-60.
77. Travis, W.D., et al., *Histological typing of lung and pleural tumors*. 1999, Berlin: Springer-Verlag.
78. Hsia, J.Y., et al., *Adenosquamous carcinoma of the lung. Surgical results compared with squamous cell and adenocarcinoma*. Scand Cardiovasc J, 1999. **33**(1): p. 29-32.
79. Nakagawa, K., et al., *Poor prognosis after lung resection for patients with adenosquamous carcinoma of the lung*. Ann Thorac Surg, 2003. **75**(6): p. 1740-4.
80. Rittinghaussen, S., et al., *Naturally occurring pulmonary tumors in rodents*, in *Monography on pathology of laboratory animals - Respiratory system*, T.C. Jones, D.L. Dungworth, and U. Mohr, Editors. 1996, Springer-Verlag: Berlin. p. 183-206.
81. Shuller, H.M., *Tumors of the respiratory tract*, in *Atlas of tumor pathology of the Fischer rat*, S.F. Stinson, H.M. Shuller, and G. Reznik, Editors. 1990, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 57-68.
82. Masse, R., *[Experimental lung carcinogenesis. Areas of application and perspectives]*. Respiration, 1990. **57**(3): p. 193-209.

83. Rehm, S., *Comparative aspects of pulmonary carcinogenesis*, in *Monography on pathology of laboratory animals - Respiratory system*, T.C. Jones, D.L. Dungworth, and U. Mohr, Editors. 1996, Springer-Verlag: Berlin. p. 158-73.
84. Hahn, F.F. and G.A. Boorman, *Neoplasia and preneoplasia of the lung*, in *Pathology of neoplasia and preneoplasia in rodents*, P. Bannasch and W. Gössner, Editors. 1997, Schattauer: Stuttgart New-York. p. 29-42.
85. Monchaux, G. and J.P. Morlier, *Influence of exposure rate on radon-induced lung cancer in rats*. J Radiol Prot, 2002. **22**(3A): p. A81-7.
86. Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell populations*. Science, 1976. **194**(4260): p. 23-8.
87. Chyczewski, L., et al., *Morphological aspects of carcinogenesis in the lung*. Lung Cancer, 2001. **34 Suppl 2**: p. S17-25.
88. Shimizu, S., et al., *High frequency of clonally related tumors in cases of multiple synchronous lung cancers as revealed by molecular diagnosis*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(10): p. 3994-9.
89. Kohno, H., et al., *p53 mutation and allelic loss of chromosome 3p, 9p of preneoplastic lesions in patients with nonsmall cell lung carcinoma*. Cancer, 1999. **85**(2): p. 341-7.
90. Pankiewicz, W., et al., *Immunohistochemical markers of cancerogenesis in the lung*. Folia Histochem Cytobiol, 2007. **45**(2): p. 65-74.
91. Slebos, R.J., et al., *p53 alterations in atypical alveolar hyperplasia of the human lung*. Hum Pathol, 1998. **29**(8): p. 801-8.
92. Ullmann, R., et al., *Bronchiolar columnar cell dysplasia--genetic analysis of a novel preneoplastic lesion of peripheral lung*. Virchows Arch, 2003. **442**(5): p. 429-36.
93. Ishida, T., et al., *Adenosquamous carcinoma of the lung. Clinicopathologic and immunohistochemical features*. Am J Clin Pathol, 1992. **97**(5): p. 678-85.
94. Nolte, T., et al., *Chemically induced pulmonary mucoepidermoid carcinoma in a female Wistar rat*. Exp Toxicol Pathol, 1995. **47**(4): p. 305-8.
95. Huang, J., et al., *Clonality of combined tumors*. Arch Pathol Lab Med, 2002. **126**(4): p. 437-41.
96. Steele, V.E. and P. Nettesheim, *Unstable cellular differentiation in adenosquamous cell carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1981. **67**(1): p. 149-54.
97. Kanazawa, H., et al., *Transition from squamous cell carcinoma to adenocarcinoma in adenosquamous carcinoma of the lung*. Am J Pathol, 2000. **156**(4): p. 1289-98.
98. Knuutila, S., K. Autio, and Y. Aalto, *Online access to CGH data of DNA sequence copy number changes*. Am J Pathol, 2000. **157**(2): p. 689.
99. Chmara, M., et al., *Loss of heterozygosity at chromosomes 3p and 17p in primary non-small cell lung cancer*. Anticancer Res, 2004. **24**(6): p. 4259-63.
100. Petitjean, A., et al., *Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database*. Hum Mutat, 2007. **28**(6): p. 622-9.
101. Hamroun, D., et al., *The UMD TP53 database and website: update and revisions*. Hum Mutat, 2006. **27**(1): p. 14-20.
102. Hainaut, P., M. Olivier, and G.P. Pfeifer, *TP53 mutation spectrum in lung cancers and mutagenic signature of components of tobacco smoke: lessons from the IARC TP53 mutation database*. Mutagenesis, 2001. **16**(6): p. 551-3; author reply 555-6.
103. Vahakangas, K., *TP53 mutations in workers exposed to occupational carcinogens*. Hum Mutat, 2003. **21**(3): p. 240-51.
104. Toyooka, S., T. Tsuda, and A.F. Gazdar, *The TP53 gene, tobacco exposure, and lung cancer*. Hum Mutat, 2003. **21**(3): p. 229-39.

105. Le Calvez, F., et al., *TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 5076-83.
106. Vahakangas, K.H., et al., *p53 and K-ras mutations in lung cancers from former and never-smoking women*. Cancer Res, 2001. **61**(11): p. 4350-6.
107. Takeshima, Y., et al., *p53 mutations in lung cancers from non-smoking atomic-bomb survivors*. Lancet, 1993. **342**(8886-8887): p. 1520-1.
108. Taylor, J.A., et al., *p53 mutation hotspot in radon-associated lung cancer*. Lancet, 1994. **343**(8889): p. 86-7.
109. McDonald, J.W., et al., *p53 and K-ras in radon-associated lung adenocarcinoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1995. **4**(7): p. 791-3.
110. Hollstein, M., et al., *p53 gene mutation analysis in tumors of patients exposed to alpha-particles*. Carcinogenesis, 1997. **18**(3): p. 511-6.
111. Yang, Q., et al., *Analysis of radon-associated squamous cell carcinomas of the lung for a p53 gene hotspot mutation*. Br J Cancer, 2000. **82**(4): p. 763-6.
112. Wiethage, T., et al., *German uranium miner study--pathological and molecular genetic findings*. German Uranium Miner Study, Research Group Pathology. Radiat Res, 1999. **152**(6 Suppl): p. S52-5.
113. Popp, W., et al., *p53 mutations and codon 213 polymorphism of p53 in lung cancers of former uranium miners*. J Cancer Res Clin Oncol, 1999. **125**(5): p. 309-12.
114. Lo, Y.M., et al., *Screening for codon 249 p53 mutation in lung cancer associated with domestic radon exposure*. Lancet, 1995. **345**(8941): p. 60.
115. Yngveson, A., et al., *p53 Mutations in lung cancer associated with residential radon exposure*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1999. **8**(5): p. 433-8.
116. Belinsky, S.A., et al., *Alterations in the K-ras and p53 genes in rat lung tumors*. Environ Health Perspect, 1997. **105 Suppl 4**: p. 901-6.
117. Yamada, Y., et al., *Comparative study on Tp53 gene mutations in lung tumors from rats exposed to 239Pu, 237Np and 222Rn*. J Radiat Res (Tokyo), 2004. **45**(1): p. 69-76.
118. Kelly, G., B.L. Stegelmeier, and F.F. Hahn, *p53 alterations in plutonium-induced F344 rat lung tumors*. Radiat Res, 1995. **142**(3): p. 263-9.
119. Yamada, Y. and Y. Oghiso, *Mutations in Tp53 gene sequences from lung tumors in rats that inhaled plutonium dioxide*. Radiat Res, 1999. **152**(6 Suppl): p. S107-9.
120. Bode, A.M. and Z. Dong, *Post-translational modification of p53 in tumorigenesis*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(10): p. 793-805.
121. Momand, J., et al., *The MDM2 gene amplification database*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(15): p. 3453-9.
122. Marchetti, A., et al., *mdm2 gene amplification and overexpression in non-small cell lung carcinomas with accumulation of the p53 protein in the absence of p53 gene mutations*. Diagn Mol Pathol, 1995. **4**(2): p. 93-7.
123. Higashiyama, M., et al., *MDM2 gene amplification and expression in non-small-cell lung cancer: immunohistochemical expression of its protein is a favourable prognostic marker in patients without p53 protein accumulation*. Br J Cancer, 1997. **75**(9): p. 1302-8.
124. Belinsky, S.A., et al., *Analysis of the K-ras and p53 pathways in X-ray-induced lung tumors in the rat*. Radiat Res, 1996. **145**(4): p. 449-56.
125. Testa, J.R., et al., *Advances in the analysis of chromosome alterations in human lung carcinomas*. Cancer Genet Cytogenet, 1997. **95**(1): p. 20-32.

126. Schwendel, A., et al., *Primary small-cell lung carcinomas and their metastases are characterized by a recurrent pattern of genetic alterations*. Int J Cancer, 1997. **74**(1): p. 86-93.
127. Spanakis, N.E., et al., *Aberrant p16 expression is correlated with hemizygous deletions at the 9p21-22 chromosome region in non-small cell lung carcinomas*. Anticancer Res, 1999. **19**(3A): p. 1893-9.
128. Ho, W.L., et al., *Loss of heterozygosity at loci of candidate tumor suppressor genes in microdissected primary non-small cell lung cancer*. Cancer Detect Prev, 2002. **26**(5): p. 343-9.
129. Yokota, J. and T. Kohno, *Molecular footprints of human lung cancer progression*. Cancer Sci, 2004. **95**(3): p. 197-204.
130. Gazzeri, S., et al., *Mechanisms of p16INK4A inactivation in non small-cell lung cancers*. Oncogene, 1998. **16**(4): p. 497-504.
131. Chen, J.T., et al., *Loss of p16 and/or pRb protein expression in NSCLC. An immunohistochemical and prognostic study*. Lung Cancer, 2001. **31**(2-3): p. 163-70.
132. Esposito, V., et al., *Cell cycle related proteins as prognostic parameters in radically resected non-small cell lung cancer*. J Clin Pathol, 2005. **58**(7): p. 734-9.
133. Cheng, Y.L., et al., *Prognostic prediction of the immunohistochemical expression of p53 and p16 in resected non-small cell lung cancer*. Eur J Cardiothorac Surg, 2003. **23**(2): p. 221-8.
134. Kraunz, K.S., et al., *Homozygous deletion of p16(INK4a) and tobacco carcinogen exposure in nonsmall cell lung cancer*. Int J Cancer, 2006. **118**(6): p. 1364-9.
135. Sanchez-Cespedes, M., et al., *Inactivation of the INK4A/ARF locus frequently coexists with TP53 mutations in non-small cell lung cancer*. Oncogene, 1999. **18**(43): p. 5843-9.
136. Niklinska, W., et al., *Detection of p16 abnormalities in early-stage non-small cell lung cancer*. Folia Histochem Cytobiol, 2001. **39 Suppl 2**: p. 30-2.
137. Merlo, A., et al., *5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers*. Nat Med, 1995. **1**(7): p. 686-92.
138. Nakata, S., et al., *The methylation status and protein expression of CDH1, p16(INK4A), and fragile histidine triad in nonsmall cell lung carcinoma: epigenetic silencing, clinical features, and prognostic significance*. Cancer, 2006. **106**(10): p. 2190-9.
139. Toyooka, S., et al., *DNA methylation profiles of lung tumors*. Mol Cancer Ther, 2001. **1**(1): p. 61-7.
140. Liu, Y., et al., *Aberrant promoter methylation of p16 and MGMT genes in lung tumors from smoking and never-smoking lung cancer patients*. Neoplasia, 2006. **8**(1): p. 46-51.
141. Honoki, K., et al., *Expression of the p16INK4a gene and methylation pattern of CpG sites in the promoter region in rat tumor cell lines*. Mol Carcinog, 2004. **39**(1): p. 10-4.
142. Kaye, F.J., *RB and cyclin dependent kinase pathways: defining a distinction between RB and p16 loss in lung cancer*. Oncogene, 2002. **21**(45): p. 6908-14.
143. Hamada, K., et al., *Association of CDKN2A(p16)/CDKN2B(p15) alterations and homozygous chromosome arm 9p deletions in human lung carcinoma*. Genes Chromosomes Cancer, 1998. **22**(3): p. 232-40.
144. Belinsky, S.A., et al., *Plutonium targets the p16 gene for inactivation by promoter hypermethylation in human lung adenocarcinoma*. Carcinogenesis, 2004. **25**(6): p. 1063-7.

145. Dano, L., et al., *CGH analysis of radon-induced rat lung tumors indicates similarities with human lung cancers*. Genes Chromosomes Cancer, 2000. **29**(1): p. 1-8.
146. Miller, M.S., *Tumor suppressor genes in rodent lung carcinogenesis-mutation of p53 does not appear to be an early lesion in lung tumor pathogenesis*. Toxicol Appl Pharmacol, 1999. **156**(1): p. 70-7.
147. Herzog, C.R., et al., *Homozygous codeletion and differential decreased expression of p15INK4b, p16INK4a-alpha and p16INK4a-beta in mouse lung tumor cells*. Oncogene, 1996. **13**(9): p. 1885-91.
148. Tam, A.S., et al., *Perturbations of the Ink4a/Arf gene locus in aflatoxin B1-induced mouse lung tumors*. Carcinogenesis, 2003. **24**(1): p. 121-32.
149. Patel, A.C., et al., *Hypermethylation of the p16 (Ink4a) promoter in B6C3F1 mouse primary lung adenocarcinomas and mouse lung cell lines*. Carcinogenesis, 2000. **21**(9): p. 1691-700.
150. Swafford, D.S., et al., *Frequent aberrant methylation of p16INK4a in primary rat lung tumors*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(3): p. 1366-74.
151. Belinsky, S.A., et al., *Aberrant CpG island methylation of the p16(INK4a) and estrogen receptor genes in rat lung tumors induced by particulate carcinogens*. Carcinogenesis, 2002. **23**(2): p. 335-9.
152. Park, M.J., et al., *Pathogenetic and biologic significance of TP14ARF alterations in nonsmall cell lung carcinoma*. Cancer Genet Cytogenet, 2003. **141**(1): p. 5-13.
153. Nicholson, S.A., et al., *Alterations of p14ARF, p53, and p73 genes involved in the E2F-1-mediated apoptotic pathways in non-small cell lung carcinoma*. Cancer Res, 2001. **61**(14): p. 5636-43.
154. Hsu, H.S., et al., *5' cytosine-phospho-guanine island methylation is responsible for p14ARF inactivation and inversely correlates with p53 overexpression in resected non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(14): p. 4734-41.
155. McDoniels-Silvers, A.L., et al., *Inactivation of both Rb and p53 pathways in mouse lung epithelial cell lines*. Exp Lung Res, 2001. **27**(3): p. 297-318.
156. Kim, D.H., et al., *p16(INK4a) and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(8): p. 3419-24.
157. Packenham, J.P., et al., *Homozygous deletions at chromosome 9p21 and mutation analysis of p16 and p15 in microdissected primary non-small cell lung cancers*. Clin Cancer Res, 1995. **1**(7): p. 687-90.
158. Seike, M., et al., *Increase in the frequency of p16INK4 gene inactivation by hypermethylation in lung cancer during the process of metastasis and its relation to the status of p53*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(11): p. 4307-13.
159. Zhou, J.X., et al., *Mechanisms of G1 checkpoint loss in resected early stage non-small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2001. **32**(1): p. 27-38.
160. Kurakawa, E., et al., *Hypermethylation of p16(INK4a) and p15(INK4b) genes in non-small cell lung cancer*. Int J Oncol, 2001. **19**(2): p. 277-81.
161. Krimpenfort, P., et al., *p15Ink4b is a critical tumour suppressor in the absence of p16Ink4a*. Nature, 2007. **448**(7156): p. 943-6.
162. Sherr, C.J., *Cancer cell cycles*. Science, 1996. **274**(5293): p. 1672-7.
163. Girard, L., et al., *Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering*. Cancer Res, 2000. **60**(17): p. 4894-906.
164. Harbour, J.W. and D.C. Dean, *The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms*. Genes Dev, 2000. **14**(19): p. 2393-409.

165. Hensel, C.H., et al., *Altered structure and expression of the human retinoblastoma susceptibility gene in small cell lung cancer*. Cancer Res, 1990. **50**(10): p. 3067-72.
166. Gouyer, V., et al., *Mechanism of retinoblastoma gene inactivation in the spectrum of neuroendocrine lung tumors*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **18**(2): p. 188-96.
167. Cagle, P.T., et al., *Differential retinoblastoma protein expression in neuroendocrine tumors of the lung. Potential diagnostic implications*. Am J Pathol, 1997. **150**(2): p. 393-400.
168. Qin, J., G. Chen, and X. Wang, *[The expression of P16 and Rb proteins in 106 cases of lung cancer]*. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2000. **23**(10): p. 588-90.
169. Mori, N., et al., *Variable mutations of the RB gene in small-cell lung carcinoma*. Oncogene, 1990. **5**(11): p. 1713-7.
170. Kaye, F.J., et al., *A single amino acid substitution results in a retinoblastoma protein defective in phosphorylation and oncoprotein binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(17): p. 6922-6.
171. Linardopoulos, S., E.S. Gonos, and D.A. Spandidos, *Abnormalities of retinoblastoma gene structure in human lung tumors*. Cancer Lett, 1993. **71**(1-3): p. 67-74.
172. Sachse, R., et al., *DNA aberrations at the retinoblastoma gene locus in human squamous cell carcinomas of the lung*. Oncogene, 1994. **9**(1): p. 39-47.
173. Tamura, K., et al., *Deletion of three distinct regions on chromosome 13q in human non-small-cell lung cancer*. Int J Cancer, 1997. **74**(1): p. 45-9.
174. Burke, L., et al., *Prognostic implications of molecular and immunohistochemical profiles of the Rb and p53 cell cycle regulatory pathways in primary non-small cell lung carcinoma*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(1): p. 232-41.
175. Leversha, M.A., et al., *Expression of p53, pRB, and p16 in lung tumours: a validation study on tissue microarrays*. J Pathol, 2003. **200**(5): p. 610-9.
176. Minna, J.D., J.M. Kurie, and T. Jacks, *A big step in the study of small cell lung cancer*. Cancer Cell, 2003. **4**(3): p. 163-6.
177. Malkinson, A.M., *Molecular comparison of human and mouse pulmonary adenocarcinomas*. Exp Lung Res, 1998. **24**(4): p. 541-55.
178. Ramakrishna, G., et al., *K-ras p21 expression and activity in lung and lung tumors*. Exp Lung Res, 2000. **26**(8): p. 659-71.
179. Petmitr, S., et al., *Mutational analysis of ras gene family in lung cancer in Thai*. Oncol Rep, 2003. **10**(5): p. 1497-501.
180. Noda, N., et al., *K-ras gene mutations in non-small cell lung cancer in Japanese*. Oncol Rep, 2001. **8**(4): p. 889-92.
181. Mitsudomi, T., et al., *Mutations of ras genes distinguish a subset of non-small-cell lung cancer cell lines from small-cell lung cancer cell lines*. Oncogene, 1991. **6**(8): p. 1353-62.
182. Zajac-Kaye, M., *Myc oncogene: a key component in cell cycle regulation and its implication for lung cancer*. Lung Cancer, 2001. **34 Suppl 2**: p. S43-6.
183. Gazzeri, S., et al., *Analysis of the activation of the myc family oncogene and of its stability over time in xenografted human lung carcinomas*. Cancer Res, 1990. **50**(5): p. 1566-70.
184. Lui, W.O., D.M. Tanenbaum, and C. Larsson, *High level amplification of 1p32-33 and 2p22-24 in small cell lung carcinomas*. Int J Oncol, 2001. **19**(3): p. 451-7.
185. Calbo, J., et al., *Genotype-phenotype relationships in a mouse model for human small-cell lung cancer*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2005. **70**: p. 225-32.
186. Mitsuuchi, Y. and J.R. Testa, *Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer*. Am J Med Genet, 2002. **115**(3): p. 183-8.

187. Yakut, T., U. Egeli, and C. Gebitekin, *Investigation of c-myc and p53 gene alterations in the tumor and surgical borderline tissues of NSCLC and effects on clinicopathologic behavior: by the FISH technique*. Lung, 2003. **181**(5): p. 245-58.
188. Minic, V., et al., *p53 and c-myc alterations in patients with non-small cell lung carcinoma in Serbia*. J Buon, 2004. **9**(1): p. 67-72.
189. Ozkara, H.A., et al., *Amplification of the c-myc oncogene in non-small cell lung cancer*. Tumori, 1999. **85**(6): p. 508-11.
190. Petersen, I., et al., *Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung*. Cancer Res, 1997. **57**(12): p. 2331-5.
191. Petersen, I., et al., *Small-cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p*. Br J Cancer, 1997. **75**(1): p. 79-86.
192. Buchhagen, D.L., *Frequent involvement of chromosome 3p alterations in lung carcinogenesis: allelotypes of 215 established cell lines at six chromosome 3p loci*. J Cell Biochem Suppl, 1996. **24**: p. 198-209.
193. Zabarovsky, E.R., M.I. Lerman, and J.D. Minna, *Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers*. Oncogene, 2002. **21**(45): p. 6915-35.
194. Sano, T. and H. Horiguchi, *Von Hippel-Lindau disease*. Microsc Res Tech, 2003. **60**(2): p. 159-64.
195. Miyakis, S., et al., *Absence of mutations in the VHL gene but frequent loss of heterozygosity at 3p25-26 in non-small cell lung carcinomas*. Lung Cancer, 2003. **39**(3): p. 273-7.
196. Zochbauer-Muller, S., et al., *5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(9): p. 3581-5.
197. Wali, A., et al., *Loss of fragile histidine triad gene expression in advanced lung cancer is consequent to allelic loss at 3p14 locus and promoter methylation*. Mol Cancer Res, 2006. **4**(2): p. 93-9.
198. Toledo, G., et al., *Loss of FHIT protein expression is related to high proliferation, low apoptosis and worse prognosis in non-small-cell lung cancer*. Mod Pathol, 2004. **17**(4): p. 440-8.
199. Deng, W.G., et al., *Induction of apoptosis by tumor suppressor FHIT via death receptor signaling pathway in human lung cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **355**(4): p. 993-9.
200. Sundaresan, V., et al., *Homozygous deletions at 3p12 in breast and lung cancer*. Oncogene, 1998. **17**(13): p. 1723-9.
201. Tsujiuchi, T., et al., *Alterations of the Dutt1/Robo1 gene in lung adenocarcinomas induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats*. Mol Carcinog, 2004. **40**(4): p. 241-6.
202. Dallol, A., et al., *Tumour specific promoter region methylation of the human homologue of the Drosophila Roundabout gene DUTT1 (ROBO1) in human cancers*. Oncogene, 2002. **21**(19): p. 3020-8.
203. Chen, H., et al., *Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer*. Oncol Rep, 2006. **15**(5): p. 1281-5.
204. Endoh, H., et al., *RASSF1A gene inactivation in non-small cell lung cancer and its clinical implication*. Int J Cancer, 2003. **106**(1): p. 45-51.
205. Whang, Y.M., et al., *RASSF1A suppresses the c-Jun-NH2-kinase pathway and inhibits cell cycle progression*. Cancer Res, 2005. **65**(9): p. 3682-90.

206. Ochi, K., et al., *Identification of semaphorin3B as a direct target of p53*. Neoplasia, 2002. **4**(1): p. 82-7.
207. Kuroki, T., et al., *Allelic loss on chromosome 3p21.3 and promoter hypermethylation of semaphorin 3B in non-small cell lung cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(12): p. 3352-5.
208. Ito, M., et al., *Frequent inactivation of RASSF1A, BLU, and SEMA3B on 3p21.3 by promoter hypermethylation and allele loss in non-small cell lung cancer*. Cancer Lett, 2005. **225**(1): p. 131-9.
209. Cho, E.S., et al., *Identification of tumor suppressor loci on the long arm of chromosome 4 in primary small cell lung cancers*. Yonsei Med J, 2002. **43**(2): p. 145-51.
210. Sterian, A., et al., *Mutational and LOH analyses of the chromosome 4q region in esophageal adenocarcinoma*. Oncology, 2006. **70**(3): p. 168-72.
211. Kamrul, H.M., R. Wadhwa, and S.C. Kaul, *CARF binds to three members (ARF, p53, and HDM2) of the p53 tumor-suppressor pathway*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1100**: p. 312-5.
212. Akhoondi, S., et al., *FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(19): p. 9006-12.
213. Tan, Y., O. Sangfelt, and C. Spruck, *The Fbxw7/hCdc4 tumor suppressor in human cancer*. Cancer Lett, 2008.
214. Woo Lee, J., et al., *Somatic mutation of hCDC4 gene is rare in lung adenocarcinomas*. Acta Oncol, 2006. **45**(4): p. 487-8.
215. Cooper, C.A., et al., *Loss of heterozygosity at 5q21 in non-small cell lung cancer: a frequent event but without evidence of apc mutation*. J Pathol, 1996. **180**(1): p. 33-7.
216. Ohgaki, H., et al., *APC mutations are infrequent but present in human lung cancer*. Cancer Lett, 2004. **207**(2): p. 197-203.
217. Grote, H.J., et al., *Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli promoter 1A in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer*. Int J Cancer, 2004. **110**(5): p. 751-5.
218. Sanz-Ortega, J., et al., *LOH at the APC/MCC gene (5Q21) is frequent in early stages of non-small cell lung cancer*. Pathol Res Pract, 1999. **195**(10): p. 677-80.
219. Chen, C., et al., *A possible tumor suppressor role of the KLF5 transcription factor in human breast cancer*. Oncogene, 2002. **21**(43): p. 6567-72.
220. Chen, C., et al., *KLF5 is frequently deleted and down-regulated but rarely mutated in prostate cancer*. Prostate, 2003. **55**(2): p. 81-8.
221. Imoto, I., et al., *Frequent silencing of the candidate tumor suppressor PCDH20 by epigenetic mechanism in non-small-cell lung cancers*. Cancer Res, 2006. **66**(9): p. 4617-26.
222. Leung, K.M., et al., *The candidate tumor suppressor ING1b can stabilize p53 by disrupting the regulation of p53 by MDM2*. Cancer Res, 2002. **62**(17): p. 4890-3.
223. Kameyama, K., et al., *Reduced ING1b gene expression plays an important role in carcinogenesis of non-small cell lung cancer patients*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(13): p. 4926-34.
224. Kim, S.K., et al., *Identification of two distinct tumor-suppressor loci on the long arm of chromosome 10 in small cell lung cancer*. Oncogene, 1998. **17**(13): p. 1749-53.
225. Petersen, S., et al., *Allelic loss on chromosome 10q in human lung cancer: association with tumour progression and metastatic phenotype*. Br J Cancer, 1998. **77**(2): p. 270-6.
226. Wu, W., et al., *Expression of DMBT1, a candidate tumor suppressor gene, is frequently lost in lung cancer*. Cancer Res, 1999. **59**(8): p. 1846-51.

227. Petersen, S., et al., *Analysis of the DMBT1 gene in carcinomas of the respiratory tract*. Int J Cancer, 2000. **88**(1): p. 71-6.
228. Racz, A., et al., *Expression analysis of genes at 3q26-q27 involved in frequent amplification in squamous cell lung carcinoma*. Eur J Cancer, 1999. **35**(4): p. 641-6.
229. Yokoi, S., et al., *TERC identified as a probable target within the 3q26 amplicon that is detected frequently in non-small cell lung cancers*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(13): p. 4705-13.
230. Okudela, K., et al., *PIK3CA mutation and amplification in human lung cancer*. Pathol Int, 2007. **57**(10): p. 664-71.
231. Zhu, C.Q., et al., *Amplification of telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer*. Br J Cancer, 2006. **94**(10): p. 1452-9.
232. Takanami, I., *The prognostic value of overexpression of Skp2 mRNA in non-small cell lung cancer*. Oncol Rep, 2005. **13**(4): p. 727-31.
233. Ramaswamy, S., et al., *A molecular signature of metastasis in primary solid tumors*. Nat Genet, 2003. **33**(1): p. 49-54.
234. Ramaswamy, S. and T.R. Golub, *DNA microarrays in clinical oncology*. J Clin Oncol, 2002. **20**(7): p. 1932-41.
235. Schmidt, U. and C.G. Begley, *Cancer diagnosis and microarrays*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(2): p. 119-24.
236. Heighway, J., et al., *Expression profiling of primary non-small cell lung cancer for target identification*. Oncogene, 2002. **21**(50): p. 7749-63.
237. Rhodes, D.R., et al., *Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(25): p. 9309-14.
238. Garber, M.E., et al., *Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13784-9.
239. Bhattacharjee, A., et al., *Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13790-5.
240. Pedersen, N., et al., *Transcriptional gene expression profiling of small cell lung cancer cells*. Cancer Res, 2003. **63**(8): p. 1943-53.
241. Bangur, C.S., et al., *Identification of genes over-expressed in small cell lung carcinoma using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray expression analysis*. Oncogene, 2002. **21**(23): p. 3814-25.
242. Petty, R.D., et al., *Gene expression profiling in non-small cell lung cancer: from molecular mechanisms to clinical application*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(10): p. 3237-48.
243. Amatschek, S., et al., *Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes*. Cancer Res, 2004. **64**(3): p. 844-56.
244. Kettunen, E., et al., *Differentially expressed genes in nonsmall cell lung cancer: expression profiling of cancer-related genes in squamous cell lung cancer*. Cancer Genet Cytogenet, 2004. **149**(2): p. 98-106.
245. Remmelink, M., et al., *Identification by means of cDNA microarray analyses of gene expression modifications in squamous non-small cell lung cancers as compared to normal bronchial epithelial tissue*. Int J Oncol, 2005. **26**(1): p. 247-58.
246. Takeuchi, T., et al., *Expression profile-defined classification of lung adenocarcinoma shows close relationship with underlying major genetic changes and clinicopathologic behaviors*. J Clin Oncol, 2006. **24**(11): p. 1679-88.

247. Stearman, R.S., et al., *Analysis of orthologous gene expression between human pulmonary adenocarcinoma and a carcinogen-induced murine model*. Am J Pathol, 2005. **167**(6): p. 1763-75.
248. Kikuchi, T., et al., *Expression profiles of non-small cell lung cancers on cDNA microarrays: identification of genes for prediction of lymph-node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs*. Oncogene, 2003. **22**(14): p. 2192-205.
249. Yamagata, N., et al., *A training-testing approach to the molecular classification of resected non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(13): p. 4695-704.
250. Panani, A.D. and C. Roussos, *Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer*. Cancer Lett, 2006. **239**(1): p. 1-9.
251. Balsara, B.R. and J.R. Testa, *Chromosomal imbalances in human lung cancer*. Oncogene, 2002. **21**(45): p. 6877-83.
252. Beau-Faller, M., et al., *Allelic imbalance at loci containing FGFR, FGF, c-Met and HGF candidate genes in non-small cell lung cancer sub-types, implication for progression*. Eur J Cancer, 2003. **39**(17): p. 2538-47.
253. Sharpless, N.E., *INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus*. Mutat Res, 2005. **576**(1-2): p. 22-38.
254. Belinsky, S.A., et al., *Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11891-6.
255. Soderback, E., et al., *Determination of CYP2D6 gene copy number by pyrosequencing*. Clin Chem, 2005. **51**(3): p. 522-31.
256. Belinsky, S.A., et al., *Deletion and differential expression of p16INK4a in mouse lung tumors*. Carcinogenesis, 1997. **18**(1): p. 115-20.
257. Sanchez-Cespedes, M., et al., *Increased loss of chromosome 9p21 but not p16 inactivation in primary non-small cell lung cancer from smokers*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 2092-6.
258. Belinsky, S.A., *Silencing of genes by promoter hypermethylation: key event in rodent and human lung cancer*. Carcinogenesis, 2005. **26**(9): p. 1481-7.
259. Kato, A., et al., *Aberrant DNA methylation of E-cadherin and p16 genes in rat lung adenocarcinomas induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine*. Mol Carcinog, 2006. **45**(2): p. 106-11.
260. Tanaka, R., et al., *Loss of function of p16 gene and prognosis of pulmonary adenocarcinoma*. Cancer, 2005. **103**(3): p. 608-15.
261. Smilenov, L.B., *Tumor development: haploinsufficiency and local network assembly*. Cancer Lett, 2006. **240**(1): p. 17-28.
262. Jacobs, J.J., et al., *The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus*. Nature, 1999. **397**(6715): p. 164-8.
263. Vonlanthen, S., et al., *The bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in non-small cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression*. Br J Cancer, 2001. **84**(10): p. 1372-6.
264. Breuer, R.H., et al., *Expression of the p16(INK4a) gene product, methylation of the p16(INK4a) promoter region and expression of the polycomb-group gene BMI-1 in squamous cell lung carcinoma and premalignant endobronchial lesions*. Lung Cancer, 2005. **48**(3): p. 299-306.
265. Wikman, H. and E. Kettunen, *Regulation of the G1/S phase of the cell cycle and alterations in the RB pathway in human lung cancer*. Expert Rev Anticancer Ther, 2006. **6**(4): p. 515-30.

266. Eymin, B., et al., *Mdm2 overexpression and p14(ARF) inactivation are two mutually exclusive events in primary human lung tumors*. *Oncogene*, 2002. **21**(17): p. 2750-61.
267. Gonin-Laurent, N., et al., *Specific TP53 mutation pattern in radiation-induced sarcomas*. *Carcinogenesis*, 2006. **27**(6): p. 1266-72.
268. Ootsuyama, A., et al., *Frequent p53 mutation in mouse tumors induced by repeated beta-irradiation*. *Mol Carcinog*, 1994. **11**(4): p. 236-42.
269. Ben, Y., et al., *Adenosquamous lung carcinoma: clinical characteristics, surgical treatment and prognosis*. *Chin Med Sci J*, 2000. **15**(4): p. 238-40.
270. Hofmann, H.S., et al., *Identification and classification of differentially expressed genes in non-small cell lung cancer by expression profiling on a global human 59,620-element oligonucleotide array*. *Oncol Rep*, 2006. **16**(3): p. 587-95.
271. Angulo, B., et al., *Expression signatures in lung cancer reveal a profile for EGFR-mutant tumours and identify selective PIK3CA overexpression by gene amplification*. *J Pathol*, 2008. **214**(3): p. 347-56.
272. Boelens, M.C., et al., *Differential expression and distribution of epithelial adhesion molecules in non-small cell lung cancer and normal bronchus*. *J Clin Pathol*, 2007. **60**(6): p. 608-14.
273. Su, Y.C., Y.C. Hsu, and C.Y. Chai, *Role of TTF-1, CK20, and CK7 immunohistochemistry for diagnosis of primary and secondary lung adenocarcinoma*. *Kaohsiung J Med Sci*, 2006. **22**(1): p. 14-9.
274. Wikman, H., et al., *Identification of differentially expressed genes in pulmonary adenocarcinoma by using cDNA array*. *Oncogene*, 2002. **21**(37): p. 5804-13.
275. Young, G.D., et al., *Differential expression and biodistribution of cytokeratin 18 and desmoplakins in non-small cell lung carcinoma subtypes*. *Lung Cancer*, 2002. **36**(2): p. 133-41.
276. Miettinen, M. and M. Sarlomo-Rikala, *Expression of calretinin, thrombomodulin, keratin 5, and mesothelin in lung carcinomas of different types: an immunohistochemical analysis of 596 tumors in comparison with epithelioid mesotheliomas of the pleura*. *Am J Surg Pathol*, 2003. **27**(2): p. 150-8.
277. Camilo, R., et al., *Expression of p63, keratin 5/6, keratin 7, and surfactant-A in non-small cell lung carcinomas*. *Hum Pathol*, 2006. **37**(5): p. 542-6.
278. Murata, K., et al., *p63 - Key molecule in the early phase of epithelial abnormality in idiopathic pulmonary fibrosis*. *Exp Mol Pathol*, 2007. **83**(3): p. 367-76.
279. Yuan, A., et al., *Correlation of total VEGF mRNA and protein expression with histologic type, tumor angiogenesis, patient survival and timing of relapse in non-small-cell lung cancer*. *Int J Cancer*, 2000. **89**(6): p. 475-83.
280. Simi, L., et al., *Simultaneous measurement of MMP9 and TIMP1 mRNA in human non small cell lung cancers by multiplex real time RT-PCR*. *Lung Cancer*, 2004. **45**(2): p. 171-9.
281. Moldvay, J., et al., *Distinct claudin expression profile in histologic subtypes of lung cancer*. *Lung Cancer*, 2007. **57**(2): p. 159-67.
282. Dobashi, Y., et al., *Active cyclin A-CDK2 complex, a possible critical factor for cell proliferation in human primary lung carcinomas*. *Am J Pathol*, 1998. **153**(3): p. 963-72.
283. Jones, J.M., et al., *Plasma fibrinogen and serum C-reactive protein are associated with non-small cell lung cancer*. *Lung Cancer*, 2006. **53**(1): p. 97-101.
284. Beckman, G., et al., *Haptoglobin groups and lung cancer*. *Hum Hered*, 1986. **36**(4): p. 258-60.
285. Yageta, M., et al., *Direct association of TSLC1 and DAL-1, two distinct tumor suppressor proteins in lung cancer*. *Cancer Res*, 2002. **62**(18): p. 5129-33.

286. Kikuchi, S., et al., *Promoter methylation of DAL-1/4.1B predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(8): p. 2954-61.
287. Kotoulas, C.S., et al., *Involvement of lymphatic metastatic spread in non-small cell lung cancer accordingly to the primary cancer location*. Lung Cancer, 2004. **44**(2): p. 183-91.
288. Guo, M., et al., *Hypermethylation of the GATA genes in lung cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(23): p. 7917-24.
289. Rieger, E., et al., *Expression of the homeobox gene HOXC4 in keratinocytes of normal skin and epithelial skin tumors is correlated with differentiation*. J Invest Dermatol, 1994. **103**(3): p. 341-6.
290. Ito, T., et al., *Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium*. Development, 2000. **127**(18): p. 3913-21.
291. Carnaghi, C., et al., *Clinical significance of neuroendocrine phenotype in non-small-cell lung cancer*. Ann Oncol, 2001. **12 Suppl 2**: p. S119-23.
292. Adjei, A.A., *The role of mitogen-activated ERK-kinase inhibitors in lung cancer therapy*. Clin Lung Cancer, 2005. **7**(3): p. 221-3.
293. Greenberg, A.K., et al., *Selective p38 activation in human non-small cell lung cancer*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **26**(5): p. 558-64.
294. Coe, B.P., et al., *Differential disruption of cell cycle pathways in small cell and non-small cell lung cancer*. Br J Cancer, 2006. **94**(12): p. 1927-35.
295. Vicent, S., et al., *ERK1/2 is activated in non-small-cell lung cancer and associated with advanced tumours*. Br J Cancer, 2004. **90**(5): p. 1047-52.
296. Zacharatos, P., et al., *Relationship of the K-ras/c-mos expression patterns with angiogenesis in non-small cell lung carcinomas*. Mol Med, 2001. **7**(9): p. 590-7.
297. Ji, H., et al., *Mutations in BRAF and KRAS converge on activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in lung cancer mouse models*. Cancer Res, 2007. **67**(10): p. 4933-9.
298. Molina, J.R. and A.A. Adjei, *The Ras/Raf/MAPK pathway*. J Thorac Oncol, 2006. **1**(1): p. 7-9.
299. Willett, C.G., et al., *Differential screening of a human chromosome 3 library identifies hepatocyte growth factor-like/macrophage-stimulating protein and its receptor in injured lung. Possible implications for neuroendocrine cell survival*. J Clin Invest, 1997. **99**(12): p. 2979-91.
300. Plummer, H.K., 3rd, M. Dhar, and H.M. Schuller, *Expression of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in human lung cells*. Respir Res, 2005. **6**: p. 29.
301. Bumming, P., et al., *Gastrointestinal stromal tumors regularly express synaptic vesicle proteins: evidence of a neuroendocrine phenotype*. Endocr Relat Cancer, 2007. **14**(3): p. 853-63.
302. Linnoila, R.I., et al., *Neuroendocrine differentiation in endocrine and nonendocrine lung carcinomas*. Am J Clin Pathol, 1988. **90**(6): p. 641-52.
303. Ionescu, D.N., et al., *Nonsmall cell lung carcinoma with neuroendocrine differentiation--an entity of no clinical or prognostic significance*. Am J Surg Pathol, 2007. **31**(1): p. 26-32.
304. Pelosi, G., et al., *Prognostic implications of neuroendocrine differentiation and hormone production in patients with Stage I nonsmall cell lung carcinoma*. Cancer, 2003. **97**(10): p. 2487-97.
305. Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman, *The versatility and universality of calcium signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 11-21.

306. Roderick, H.L. and S.J. Cook, *Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(5): p. 361-75.
307. Gudermann, T. and S. Roelle, *Calcium-dependent growth regulation of small cell lung cancer cells by neuropeptides*. Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(4): p. 1069-84.
308. Monchaux, G., et al., *Carcinogenic and Cocarcinogenic Effects of Radon and Radon Daughters in Rats*. Environ Health Perspect, 1994. **102**(1): p. 64-73.
309. Kallioniemi, A., et al., *Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors*. Science, 1992. **258**(5083): p. 818-21.
310. el-Rifai, W., et al., *Optimization of comparative genomic hybridization using fluorochrome conjugated to dCTP and dUTP nucleotides*. Lab Invest, 1997. **77**(6): p. 699-700.
311. Lee, M.L., et al., *Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(18): p. 9834-9.
312. Tu, Y., G. Stolovitzky, and U. Klein, *Quantitative noise analysis for gene expression microarray experiments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(22): p. 14031-6.
313. Tseng, G.C., et al., *Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(12): p. 2549-57.

Caractérisation moléculaire de tumeurs pulmonaires radon-induites chez le rat

Le radon est un carcinogène pulmonaire avéré chez l'homme à fortes doses mais l'existence d'un risque de cancer à faibles doses n'est pas établie car les approches épidémiologiques se heurtent, à ce niveau de doses, à de nombreux facteurs confondants. Ces données soulignent la nécessité de disposer d'un modèle d'étude des tumeurs pulmonaires chez l'animal.

Le but de ce travail de thèse est de caractériser, sur le plan moléculaire, une série de tumeurs pulmonaires radon-induites chez le rat qui comprend des adénocarcinomes (AC), des carcinomes épidermoïdes (Sq) et des carcinomes adénosquameux (ASq) formés des composantes cellulaires AC et Sq. Une analyse cytogénétique globale de ces tumeurs par la technique de CGH a permis de définir des déséquilibres récurrents de régions chromosomiques, sur lesquelles ont été ciblés des gènes candidats potentiellement impliqués dans le développement des tumeurs, comme p16Ink4a, p19Arf, Rb1, K-Ras ou c-Myc. Une analyse plus précise des voies p16Ink4a/Cdk4/Rb1 et p19Arf/Mdm2/Tp53 a été menée et a permis de mettre en évidence une inactivation fréquente de la voie Rb1, par la perte d'expression de la protéine p16^{Ink4a}, indiquant que cette voie joue un rôle majeur dans le développement de ces tumeurs pulmonaires. Enfin, une analyse transcriptomique comparative des trois types de tumeurs induites a révélé que les tumeurs complexes ASq ont un profil d'expression génique qui reflète leur nature composite mais qu'elles présentent également des spécificités.

L'ensemble de ce travail a mis à jour des caractéristiques moléculaires communes aux tumeurs pulmonaires murines et humaines qui encouragent à poursuivre l'étude des spécificités des tumeurs pulmonaires radio-induites chez le rat pour aider à une meilleure caractérisation de ces tumeurs chez l'homme.

Mots-clés : cancer du poumon, radon, rat, CGH, transcriptome, p16Ink4a, carcinome adénosquameux

Molecular characterization of radon-induced rat lung tumors

The radon gas is a well known lung carcinogenic factor in human at high doses but the cancer risk at low doses is not established. Indeed, epidemiological studies at low doses are difficult to conduct because of the human exposure to other lung carcinogenic factors. These data underlined the necessity to conduct experiments on lung tumors developed on animal model.

The aim of this work was to characterize rat lung tumors by working on a series of radon-induced tumors that included adenocarcinomas (AC), squamous cell carcinomas (SCC) and adenosquamous carcinomas (ASC), that are mixed tumors with both AC and SCC cellular components. A CGH analysis of the three types of tumors allowed us to define chromosomal recurrent unbalances and to target candidate genes potentially implicated in lung carcinogenesis, as p16Ink4a, p19Arf, Rb1, K-Ras or c-Myc. A more precise analysis of the p16Ink4a/Cdk4/Rb1 and p19Arf/Mdm2/Tp53 pathways was performed and indicated that the Rb1 pathway was frequently inactivated through an absence of p16^{Ink4a} protein expression, indicating that it has a major role in rat lung carcinogenesis. Finally, a comparative transcriptomic analysis of the three types of tumors allowed us to show for the first time that the complex tumors ASC have a transcriptomic profile in accordance with their mixed nature but that they also display their own expression profiles specificities.

This work allowed us to find molecular characteristics common to murine and human lung tumors, indicating that the model of lung tumors in rat is pertinent to search for radiation-induced lung tumors specificities and to help for a better molecular identification of this type of tumors in human.

Key words : lung cancer, radon, rat, CGH, transcriptome, p16Ink4a, adenosquamous carcinoma

Laboratoire d'accueil

Laboratoire de Cancérologie Expérimentale (LCE) - Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire (iRCM)
Direction des Sciences du vivant (DSV) - Commissariat à l'Energie Atomique (CEA)
BP6 – 92265 Fontenay-aux-Roses Cedex – France